

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR  
YVES GINGRAS

L'EFFET INHIBITEUR DES POLYAMINES SPERMINE ET  
SPERMIDINE SUR LE COMPLEXE PROTÉIQUE DU  
PHOTOSYSTÈME II

DÉCEMBRE 1998

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à souligner ma gratitude et ma reconnaissance à mon directeur de recherche, le Dr Robert Carpentier, pour son soutien de tous les instants et son aide précieuse au cours de ses longues années d'études.

Je remercie Johanne Harnois, professionnelle de recherche, pour son aide technique, ses judicieux conseils et son sens de l'humour qui donne un esprit de franche camaraderie, presque familial, au labo du Pierre-Boucher.

Je remercie également tous mes condisciples de laboratoire pour les nombreuses conversations scientifiques et les autres, encore bien plus nombreuses, pas du tout scientifiques. Je tiens à remercier mon collègue Michel Paradis pour son aide technique et sa grande collaboration, sans qui, il aurait été bien difficile de mener ce projet à bon port. Un gros merci à mon grand ami et collègue, Sylvain Versailles, qui est aussi le parrain de mon fils, Rémy.

Merci à ma mère, Lisette Gingras, pour ses conseils et encouragements au cours de mon projet. Merci au Dr Michelle Bernier pour ses conseils photosynthétiques et plus particulièrement pour son rôle d'intermédiaire, qui m'a permis de rencontrer la femme de ma vie, Julie Trudel. Je remercie Louise Laroche, René Trudel, Geneviève Trudel ainsi que Robert Bourassa pour leurs encouragements, leurs chaleurs, leurs gentilleses et leurs accueils. Un merci très spécial à ma compagne de vie, Julie pour sa présence réconfortante, chaleureuse et son soutien tout le long de cette maîtrise et pour le beau garçon qu'elle m'a donnée le 25 octobre 1997, Rémy. Merci à mon fils, Rémy, âgé de 14 mois pour toutes les joies que tu me donnes.



2.6.2	La PQ: navette mobile entre le PSII et le cyt $b_6f$	26
2.6.3	Le complexe du cyt $b_6f$	27
2.6.4	La PC: navette entre le cyt $b_6f$ et le PSI	29
2.6.5	Le centre réactionnel du PSI, le P700	30
2.6.6	La réduction du $NADP^+$	34
2.6.7	Régulation du transport linéaire et cyclique d'électrons	35
2.7	L'ATP synthétase et le couplage énergétique	38
2.7.1	Le complexe $CF_0F_1$	38
2.7.2	Le couplage énergétique	39
2.8	Le photosystème II	42
2.8.1	L'hétérodimère D1/D2	42
2.8.2	Le cytochrome b-559	45
2.8.3	Les protéines extrinsèques: 33, 24 et 16 kDa	46
2.8.3.1	La protéine de 33 kDa	47
2.8.3.2	La protéine de 24 kDa	48
2.8.3.3	La protéine de 16 kDa	49
2.8.4	Les cofacteurs inorganiques du CDO	50
2.8.5	Fonction du CDO	52
<u>3-LES POLYAMINES</u>		54
<u>4-MATÉRIELS ET MÉTHODES</u>		62
4.1	Isolation de membranes enrichies en PSII	62
4.2	Dégagement d'oxygène	64
4.3	Réduction du DCIP	65
4.4	Électrophorèse (SDS-PAGE)	66
4.5	Fluorimètre PAM	68

4.6	Spectroscopie d'absorbance .....	69
<b>5-RÉSULTATS ET DISCUSSIONS .....</b>		<b>70</b>
5.1	Effet de la spermine et de la spermidine sur le .....	71
	dégagement d'oxygène	
5.1.1	Courbe d'inhibition de la SPM et de la SPD .....	73
5.1.2	L'importance du temps d'incubation sur .....	78
	l'inhibition du PSII par les PA	
5.1.3	Effets des sels sur le PSII inhibé par la .....	83
	spermine et la spermidine	
5.1.4	L'étude des polyamines par photoréduction .....	91
	du DCIP	
5.1.5	Discussion .....	93
5.2	Analyse par électrophorèse des PSII inhibés .....	97
	par la SPM et la SPD	
5.2.1	Effet de la spermidine sur le PSII .....	100
5.2.2	Effet de la spermine sur le PSII .....	106
5.2.3	Discussion .....	109
5.3	Étude par fluorescence de l'effet inhibiteur de .....	111
	la SPM et de la SPD sur le PSII	
5.3.1	Introduction à la fluorescence .....	111
5.3.1.1	Définition de la fluorescence constante .....	112
5.3.1.2	Définition de la fluorescence variable .....	112
5.3.1.3	Définition de la fluorescence maximale .....	113
5.3.1.4	Formules utilisées pour analyser les .....	113
	résultats de fluorescence	
5.3.2	Étude de la SPD par fluorescence .....	115
5.3.2.1	Effets des ions calcium et chlore sur le .....	121

PSII inhibé par la SPD par fluorescence	
5.3.3	Étude de la SPM par fluorescence .....124
5.3.3.1	Effet du calcium sur le PSII inhibé .....132
	par la SPM
5.3.4	Discussion .....134
5.4	Étude des propriétés d'absorption des pigments .....135
5.4.1	Discussion .....139
<u>6-CONCLUSION FINALE</u> .....140	
6.1	Action sur le côté donneur d'électrons .....140
6.2	Effet du calcium et du chlore .....141
6.3	Effet des polyamines sur les antennes et la Chl <u>a</u> .....142
6.4	Mode d'action des polyamines (exogènes) .....143
	à très haute concentration
6.5	Perspectives futures .....146
<u>7-RÉFÉRENCES</u> .....147	

## LISTE DES TABLEAUX

<u>TABLEAU 1</u>	Effets des temps d'incubations sur le .....79 pourcentage d'inhibition du PSII incubé en présence de SPM 0.04
<u>TABLEAU 2</u>	Effets des temps d'incubations sur le .....81 pourcentage d'inhibition du PSII incubé en présence de SPD 1 mM
<u>TABLEAU 3</u>	Effets des sels sur le pourcentage d'inhibition .....84 des PSII traités avec 1 mM de SPD.
<u>TABLEAU 4</u>	Effets des sels sur le pourcentage d'inhibition .....86 des PSII traités avec 0.04 mM de SPM.
<u>TABLEAU 5</u>	Effets des concentrations croissantes de NaCl .....88 sur le pourcentage d'inhibition du PSII traité avec SPD 1.4 mM.
<u>TABLEAU 6</u>	Effets des concentrations croissantes de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ .....89 sur le pourcentage d'inhibition du PSII traité avec SPD 1.4 mM.
<u>TABLEAU 7</u>	Effets des concentrations croissantes de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ .....90 sur le pourcentage d'inhibition du PSII traité avec SPM 0.1 mM.
<u>TABLEAU 8</u>	Effets du $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ sur $\phi_0$ et sur $F_0/F_m$ du PSII .....122 traité avec 3 mM de SPD.
<u>TABLEAU 9</u>	Effets du chlore sur l'inhibition du PSII .....123 traité par la SPD.



<u>TABLEAU 10</u>	Effets du calcium sur l'inhibition du PSII traité par la SPM. ....	133
<u>TABLEAU 11</u>	Tableau des rapports d'absorbances des PSII contrôles comparativement aux PSII inhibés. ....	138

## LISTE DES FIGURES

<u>FIGURE 1</u>	Modèle schématique de la Chl a .....	11
<u>FIGURE 2</u>	Représentation schématique du chloroplaste .....	18
<u>FIGURE 3</u>	Modèle montrant la distribution des complexes $\alpha$ et $\beta$ .....	20
<u>FIGURE 4</u>	Modèle des membranes thylacoïdiennes .....	21
<u>FIGURE 5</u>	Le schéma en Z de la photosynthèse oxygénique .....	23
<u>FIGURE 6</u>	Transport des électrons dans les thylacoïdes .....	24
<u>FIGURE 7</u>	Organisation du PSI .....	32
<u>FIGURE 8</u>	Mécanisme du transport cyclique des $e^-$ .....	36
<u>FIGURE 9</u>	Schéma de la phosphorylation des CCLII .....	37
<u>FIGURE 10</u>	Modèle schématique de l'ATP synthétase et du couplage énergétique contrôlé par le $Ca^{+2}$ .....	39
<u>FIGURE 11</u>	Modèle schématique du PSII montrant le transport des $e^-$ ainsi que les états d'oxydation de l'eau (S <sub>0</sub> -S <sub>4</sub> ) .....	44

<u>FIGURE 12</u>	Les états redox du dégagement d'O <sub>2</sub> et des ions Mn .....	52
<u>FIGURE 13</u>	Biosynthèse des polyamines; putrescine, SPD et SPM .....	57
<u>FIGURE 14</u>	Courbe d'inhibition du PSII en présence de SPM .....	74
<u>FIGURE 15</u>	Courbe d'inhibition du PSII en présence de SPD .....	76
<u>FIGURE 16</u>	Gel d'électrophorèse de membrane .....	102
	de PSII traité avec la SPD.	
<u>FIGURE 17</u>	Gel d'électrophorèse de surnageant du PSII .....	103
	traité avec la SPD	
<u>FIGURE 18</u>	Gel d'électrophorèse de l'effet du Ca <sup>2+</sup> et du Cl <sup>-</sup> sur .....	105
	le PSII traité avec la SPD	
<u>FIGURE 19</u>	Gel d'électrophorèse de culots de PSII traités .....	107
	avec la SPM	
<u>FIGURE 20</u>	Gel d'électrophorèse de l'effet du Ca <sup>2+</sup> sur des .....	108
	PSII traités avec la SPM	
<u>FIGURE 21</u>	Schéma d'un tracé fluorimétrique avec les .....	114
	différents paramètres utilisés en fluorescence	

<u>FIGURE 22</u>	Courbe de fluorescence chlorophyllienne .....116 du PSII contrôle et du PSII inhibé par 3 mM de SPD
<u>FIGURE 23</u>	Graphique de $F_o/F_m$ et $F_o$ en fonction .....118 des concentrations de SPD
<u>FIGURE 24</u>	Graphique du $\phi_o$ , $F_m$ et $F_{vmax}$ .....120 en fonction des concentrations de SPD
<u>FIGURE 25</u>	Courbe de fluorescence chlorophyllienne .....125 du PSII contrôle et du PSII inhibé par 3 mM de SPM
<u>FIGURE 26</u>	Graphique de $F_o/F_m$ en fonction des concentrations .....127 de SPM
<u>FIGURE 27</u>	Graphique du $\phi_o$ en fonction des concentrations .....129 de SPM
<u>FIGURE 28</u>	Graphique de $F_o$ , $F_{vmax}$ et $F_m$ .....130 en fonction des concentrations de SPM
<u>FIGURE 29</u>	Spectre d'absorbance d'une suspension .....136 de membranes enrichies en PSII

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

CCLI	= complexe collecteur de lumière associé au PSI
CCLII	= complexe collecteur de lumière associé au PSII
CDO	= complexe de dégagement d'oxygène
Chl	= chlorophylle
Cyt $b_6f$	= cytochrome $b_6f$
DPC	= diphénylcarbazine
Fd	= ferrédoxine
Fp	= ferrédoxine NADP <sup>+</sup> réductase
F <sub>o</sub>	= fluorescence constante
F <sub>m</sub>	= fluorescence maximale
F <sub>v</sub>	= fluorescence variable
F <sub>vmax</sub>	= fluorescence variable maximale
kDa	= kiloDalton
PAM	= Pulse Amplitude Modulated
PC	= plastocyanine
PFD	= densité du flux photonique
Ph	= phéophytine
$\phi_0$	= rendement quantique maximal photochimique du PSII
PM	= poids moléculaire
PQ	= plastoquinone
PQH <sub>2</sub>	= plastoquinol
PSI	= photosystème I
PSII	= photosystème II
PUT	= putrescine
QA	= quinone A
QB	= quinone B
SPD	= spermidine
SPM	= spermine

## 1- INTRODUCTION

Chez les plantes, des réactions sont produites dans le but de produire des hexoses. À partir du  $\text{CO}_2$  et de  $\text{H}_2\text{O}$ , l'équation de base est



Cette réaction, essentielle aux végétaux, se fait grâce à des pigments tels que les Chls et les caroténoïdes qui absorbent la lumière. C'est le phénomène connu de la photosynthèse.

Il existe deux étapes importantes dans la photosynthèse. La première, la phase lumineuse, consiste à l'estérification de l'ADP par un phosphate inorganique pour ainsi former l'ATP et la réduction du  $\text{NADP}^+$  en NADPH. La seconde, la phase sombre, s'effectue dans le stroma des chloroplastes où les produits de la phase lumineuse (ATP et NADPH) sont utilisés pour réduire le  $\text{CO}_2$  en hexoses par le cycle de Calvin.

La photosynthèse s'effectue dans certains organites situés à l'intérieur de la cellule végétale, les chloroplastes. Ces chloroplastes ont une membrane interne qui se replie vers l'intérieur, formant les thylacoïdes. C'est dans ces thylacoïdes, grâce à une chaîne de transport d'électrons, que s'effectuent les réactions photosynthétiques.

La chaîne de transport d'électrons est constituée de quatre complexes protéiques: le photosystème II (PSII) qui oxyde l' $\text{H}_2\text{O}$ , le cytochrome  $b_6f$  qui est le lien majeur entre les complexes du PSII et le PSI, le photosystème I (PSI) qui fournit les électrons à la ferrédoxine  $\text{NADP}^+$  réductase qui réduit le  $\text{NADP}^+$  en NADPH et finalement l'ATP synthétase <sup>1</sup>. Il y a aussi deux navettes mobiles: la plastoquinone et la plastocyanine. Cette chaîne de protéines a un rôle capital dans le transport d'électrons afin de réduire le  $\text{NADP}^+$  en NADPH et dans la production de l'ATP.

Le début du transport d'électrons est assuré par le PSII qui capte l'énergie lumineuse grâce aux complexes collecteurs de lumière associés au PSII (CCLII) et aux pigments photosynthétiques dont la Chl. Lorsque celle-ci est excitée, il y a transmission de l'excitation électronique à d'autres Chl voisines. Cette excitation se dirige vers le centre réactionnel du PSII, le P680. Le P680 est le lieu de la "séparation de charge". Cette séparation de charge

libère un électron qui va être donné à la phéophytine puis aux quinones A et B<sup>1</sup>. La quinone A donne séquentiellement deux électrons au site de la quinone B afin de permettre à  $2\text{H}^+$  de se combiner à la plastoquinone qui deviendra plastoquinol. Ce dernier transfère deux électrons au cytochrome  $\text{b}_6\text{f}$ .

En même temps que la séparation de charge par le P680 du PSII, deux molécules d' $\text{H}_2\text{O}$  sont scindées simultanément par le complexe de dégagement d'oxygène en  $4\text{H}^+$ ,  $\text{O}_2$  et en  $4\text{e}^-$ . Ce complexe est constitué de trois protéines extrinsèques de 33, 24 et 16 kDa. Ainsi que de quatre manganèses qui possèdent un rôle catalytique d'oxydation d' $\text{H}_2\text{O}$ . Les électrons venant d' $\text{H}_2\text{O}$  vont réduire une tyrosine Z pour réduire par la suite le P680.

Le cyt  $\text{b}_6\text{f}$  va fournir ses électrons à la plastocyanine. Celle-ci est une protéine extrinsèque diffusant dans le lumen et qui transfère ses électrons au centre réactionnel du PSI, le P700. Les électrons venant du P700 sont transférés aux accepteurs  $\text{A}_0$  et  $\text{A}_1$  puis ensuite des systèmes Fe-S, X, B et A. Cette dernière protéine (Fe-S) va réduire la ferrédoxine NADP<sup>+</sup> réductase qui catalyse la réduction de NADP<sup>+</sup> en NADPH<sup>1</sup>.



Parmi les quatre constituants protéiques importants de la chaîne d'électrons, un complexe sera particulièrement abordé; celui du photosystème II qui est le sujet principal de ma maîtrise. Le PSII est un complexe constitué de protéines importantes. Il y a l'hétérodimère D1-D2, le cytochrome b-559, des protéines pigmentaires (CCLII, CP43, CP47, CP29, CP27 et la CP25) et le complexe de dégagement d'oxygène. On retrouve la tyrosine Z, le P680, la phéophytine et les quinones A et B sur l'hétérodimère D1-D2<sup>2</sup>. Ce complexe a pour fonction d'oxyder deux H<sub>2</sub>O selon la réaction suivante:



Les 4H<sup>+</sup> sont relargués dans le lumen des thylacoïdes et assurent un gradient de pH nécessaire au bon fonctionnement de l'ATP synthétase. L'oxygène produit par cette réaction est dégagé par la plante. On mesure l'activité du PSII en vérifiant le niveau de dégagement d'oxygène.

Les polyamines se retrouvent à l'état naturel chez les plantes où ils jouent un rôle essentiel au bien-être des végétaux. Ils ont des rôles multiples au sein du développement végétal: la division cellulaire, le développement des racines, la floraison, l'apparition des fruits etc.. On retrouve des traces de polyamines dans l'appareil photosynthétique sous forme de cations libres, mais

aussi conjugués à des petites molécules telles que l'acide phénolique ou à des macromolécules biologiques. Ils occupent également une place prépondérante dans les liaisons avec les acides nucléiques, les phospholipides et avec les protéines. Au niveau du PSII, les polyamines putrescine, spermine et spermidine s'y retrouvent à l'état de traces et sont vitaux pour la plante <sup>3</sup>.

Dans le cadre de mon projet de maîtrise, l'objectif de mes travaux est d'étudier l'interaction des polyamines spermine ( SPM ) et spermidine ( SPD ) avec le photosystème II. Étant donné que celles-ci sont présents à l'état de traces in vivo au niveau du PSII, une question vient à l'esprit: l'ajout de manière exogène (à des concentrations plus grandes que ceux retrouvées in vivo) des polyamines SPM et SPD avec le PSII produit-il des effets sur la structure protéique, sur le dégagement d'oxygène, sur les complexes Chl-protéine?

Pour tenter de répondre à cette interrogation, j'ai employé quatre procédés expérimentaux connus.

La première partie de mon expérience consiste à observer l'effet de la SPM et de la SPD sur le dégagement d'oxygène, principal indicateur de l'activité du PSII.

L'objet de la deuxième partie est de vérifier les modifications de la composition en polypeptides d'une ou des protéines du PSII par la technique d'électrophorèse SDS-PAGE.

En troisième partie, l'interaction des deux polyamines est expertisée à l'aide de la méthode de fluorescence (fluoromètre PAM) afin de tenter de déterminer le site d'inhibition; côté donneur ou le côté accepteur d'électrons du PSII.

En dernière partie, la spectroscopie d'absorbance de la Chl permet d'essayer de détecter les modifications possibles des complexes Chl-protéine du PSII par les polyamines SPM et SPD.

## 2- LA PHOTOSYNTHÈSE

### 2.1 HISTORIQUE

Bien que le phénomène essentiel de la photosynthèse soit l'assimilation du  $\text{CO}_2$ , c'est le rejet concomitant d' $\text{O}_2$  qui fut le premier découvert. Priestley, en Angleterre (1771-1773), montra qu'une plante, mise sous cloche, peut vivre de longs mois sans renouvellement d'air, qu'elle peut régénérer l'air vicié par la combustion d'une bougie, et permettre à une souris de demeurer avec elle sous une cloche sans être asphyxiée. Mais, il ne comprit pas l'importance de la lumière dans ce phénomène.

C'est Ingen-Housz (1779), physicien hollandais, qui démontra que l'émission d' $\text{O}_2$  n'est produite que par les organes verts et à la lumière; Senebier (1782-1783), enfin, montra que du gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ) était absorbé en même temps que de l' $\text{O}_2$  était émis.

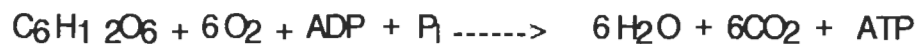
Beaucoup plus tard, en 1845, et après que le phénomène eût été précisé par différents chercheurs, le physicien Mayer suggère que la lumière agit en tant que source d'énergie. Enfin Sachs, en 1864, montre que les chloroplastes à la lumière synthétisent des grains d'amidon <sup>1</sup>.

Le concept de base de l'absorption de la lumière et sa transformation en énergie électrochimique libre était développé en 1932 par Emerson et Arnold; ils découvrirent qu'une seule molécule d'O<sub>2</sub> est dégagée par 2500 molécules de Chl quand les cellules de Chlorelles étaient illuminées par des courts flashes répétitifs (10 msec) d'intensité saturante. Les découvertes de Graffron et Wohl (1936) ont démontré que la majorité des molécules de Chl fonctionnent comme antennes.

## 2.2 LE MÉCANISME PHOTOSYNTHÉTIQUE

Comme on le sait, les animaux et les humains oxydent le glucose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) pour en faire du CO<sub>2</sub> et de l'H<sub>2</sub>O afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP par la glycolyse, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. L'ATP formé est important pour les réactions d'anabolisme.

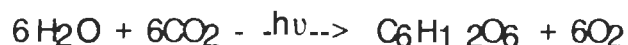
la réaction globale est:



Chez les plantes, il existe un mécanisme inverse de celui rencontré chez l'homme qu'on appelle la PHOTOSYNTHÈSE. La machine photosynthétique fonctionne de la façon suivante: l'énergie photonique momentanément stockée dans certaines molécules de Chl subissant des transitions électroniques est ensuite transmise, par une suite de réactions complexes mettant en jeu des transferts d' $e^-$ , à des cofacteurs et sert finalement à la biosynthèse de molécules organiques. Bien que seulement 1 % de l'énergie solaire incidente soit utilisée pour la photosynthèse, les plantes fixent annuellement  $3 \times 10^{21}$  joules d'énergie d'origine solaire (pour comparaison, la consommation mondiale actuelle d'énergie prise sous toutes ses formes est de  $3 \times 10^{20}$  joules) <sup>4</sup>. Les plantes oxydent l' $H_2O$  pour donner des  $H^+$ ,  $e^-$  et  $O_2$ . Les  $e^-$  et le gradient de protons vont permettre la formation de molécules énergétiques telles que l'ATP et le NADPH.

Il existe deux étapes dans la photosynthèse: la première est la phase lumineuse qui inclut 1) absorption de lumière, 2) réaction photochimique primaire et transport d'électrons et 3) production de NADPH et d'ATP. La seconde étape s'effectue dans le stroma des chloroplastes où le NADPH et l'ATP sont utilisés pour réduire le  $CO_2$  en hexoses par le cycle de Calvin, ce qui correspond à la phase sombre.

La réaction globale est:



L'amidon est le glucide le plus fréquemment élaboré au terme de la photosynthèse, en général, l'amidon formé s'accumule en une réserve temporaire qui sera dégradée par la suite, la nuit principalement. Les produits de cette dégradation conduisent à des composés qui traversent l'enveloppe du chloroplaste et gagnent le cytosol, où ils se transforment en saccharose. C'est sous cette forme que les assimilats carbonés quittent les feuilles <sup>4</sup>.

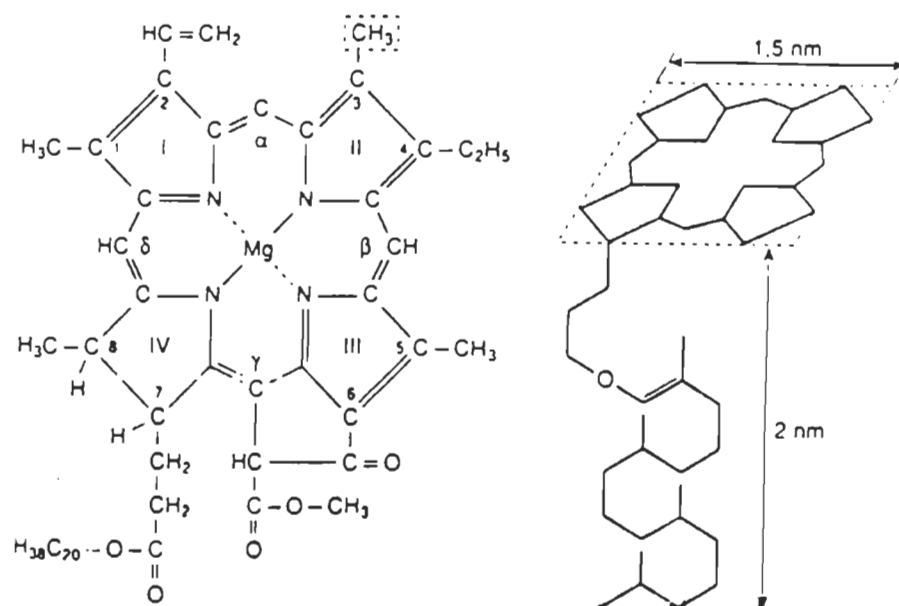
## **2.3 CAPTURE ET TRANSFERT DE L'ÉNERGIE**

### **2.3.1 LA CHLOROPHYLLE**

La Chl est le pigment principal dans la photosynthèse. Il contient une porphyrine (quatre noyaux pyrroles en cercle) avec un atome de magnésium au centre et un alcool à longue chaîne; le phytol ( $C_{20}H_{41}OH$ ) <sup>1</sup>.

Schématiquement, la molécule de Chl se présente comme une sorte de cerf-volant dont le corps (1.5 nm de diamètre), tétrapyrrolique, serait hydrophile tandis que la queue (le phytol, 2 nm de long) serait lipophile (voir figure 1)

La Chl a est présente chez tous les végétaux tandis que la Chl b, dans laquelle un  $\text{CH}_3$  est remplacé par un  $\text{CHO}$ , ne se rencontre que chez les végétaux supérieurs et les algues vertes.



**FIGURE 1:** Modèle schématique de la Chl a. La Chl b n'en diffère que par le  $-\text{CH}_3$  encadré, remplacé par un  $-\text{CHO}$  <sup>1</sup>.



### 2.3.2 LES PIGMENTS SECONDAIRES

Les caroténoïdes, présents chez tous les phototrophes, sont des pigments lipophiles, insolubles dans l'eau, apparentés aux lipides comportant 40 carbones et constitués de résidus isoprène (8 isoprènes au total). Ces pigments sont responsables de capter les  $\lambda$  du spectre autres que celles absorbées par la Chl, afin de pouvoir absorber plus d'énergie lumineuse.

Les caroténoïdes comprennent deux classes de pigments: (1) les carotènes, qui sont des carbures d'hydrogènes, et dont le type est le  $\beta$ -carotène ( $C_{40}H_{56}$ ) et (2) les xanthophylles, qui sont des formes oxydées (alcools ou cétones), par exemple la lutéine.

Les carotènes et les xanthophylles absorbent dans le bleu-vert avec un maximum vers 480-500 nm<sup>1</sup>. Le cycle des xanthophylles est impliqué dans la photoprotection des lipides membranaires. Les xanthophylles vont apparaître dans la bicouche lipidique lors de l'excès d'illumination afin de renforcer l'action du  $\alpha$ -Tocophérol, le seul produit photoprotecteur qui est localisé dans la bicouche des thylacoïdes<sup>5</sup>.

### **2.3.3 LES COMPLEXES PIGMENTS-PROTÉINES**

Les complexes pigments-protéines, sont les systèmes antennaires et les centres réactionnels des photosystèmes I et II présents dans la membrane du thylacoïde. Les propriétés optiques de ces ensembles ne sont pas seulement déterminées par les propriétés des molécules pigmentaires, ni par leur interaction mutuelle, mais dépendent aussi de la matrice protéique et de ses interactions avec les pigments.

#### **2.3.3.1 L'ADAPTATION À LA LUMIÈRE**

Une utilisation optimale des radiations solaires par les organismes photosynthétiques nécessite des mécanismes d'adaptations aux différentes conditions environnementales (lumière, température, minéraux, etc.). De tous ces paramètres, l'adaptation aux conditions de la lumière joue un rôle clé. Les organismes sont exposés à une large variation de densités du flux photonique (PFD) et l'adaptation aux conditions de la PFD se produit au niveau excitonique, c'est à dire au niveau de l'état électronique excité des pigments dont la réorganisation des liaisons chimiques est contrôlée par le nombre de photons absorbés. Il n'est donc pas surprenant de trouver une grande variété de systèmes antennaires chez les phototrophes producteurs d'oxygène. En plus de l'adaptation des plantes aux conditions de la PFD, l'exploitation appropriée des radiations solaires nécessite une adaptation chromatique. Afin de répondre à cette

exigence, les systèmes antennaires contiennent différents pigments accessoires qui transfèrent leur excitation, via la Chl a, aux centres réactionnels.

### **2.3.3.2 LES SYSTÈMES ANTENNAIRES**

Durant le développement évolutif des membranes externe des thylacoïdes, des cyanobactéries aux plantes vertes, l'organisation structurelle des systèmes antennaires a changé radicalement. Contrairement aux phycobilisomes qui sont associés avec la surface externe des thylacoïdes, le système antenne des plantes vertes est incorporé dans la membrane.

Ces systèmes forment des complexes pigments-protéines intrinsèques connus sous le nom de complexes collecteurs de lumière (CCL). La structure de ces complexes a été récemment déterminée et il est très probable qu'ils se présentent sous formes d'agrégats de sous-unités de complexes pigments-protéines contenant chacun de 3 à 20 molécules de pigments. Ils sont considérés comme des étagères de pigments en forme d'entonnoir collectant la lumière et la canalisant vers les pigments photoactifs des centres réactionnels dont un seul est considéré agir comme piège, causant la photoconversion de l'énergie d'excitation qui lui est transmise. L'état électroniquement excité, généré par l'absorption de la lumière migre via le transfert de

l'énergie d'excitation à l'état singulet, jusqu'au pigment photoactif du centre réactionnel où il est photochimiquement piégé.

### **2.3.3.3 LES CENTRES RÉACTIONNELS**

L'énergie d'excitation est concentrée dans les centres réactionnels dans lesquels des molécules de Chl spécialisées assurent la conversion de l'énergie. Les Chl du centre réactionnel sont toujours trouvées sous la forme de dimère de Chl, cette forme aide à la délocalisation de l'énergie. Ces dimères sont désignés par la lettre P, pour pigment ainsi que par leur longueur d'onde maximale. Ainsi le P680 et le P700 sont les dimères de Chl formant les centres réactionnels du PSII et du PSI respectivement, chez les cyanobactéries, algues rouges, algues vertes et les plantes supérieures. Ces deux centres forment des trappes pour l'énergie lumineuse et sont arrangés en complexes moléculaires à proximité d'autres molécules, qui sont soit des accepteurs, soit des donneurs d' $e^-$ .

L'absorption de l'énergie lumineuse délocalise l'un des  $e^-$  du dimère de Chl de son état fondamental, et devient électroniquement excité ( $\text{Chl}^*$ ). Durant la transition de cette énergie, l' $e^-$  est capturé par une molécule accepteur d' $e^-$  (A), qui devient réduite. Cette séparation de charges primaire constitue l'étape initiale du

transport d'électrons, laquelle est nécessaire pour former de l'énergie chimique sous forme de NADPH et d'ATP, utilisés dans le cycle de Calvin. Ce dimère dépourvu de son électron, est réduit par une autre molécule de donneur voisine (D), et retourne à son état fondamental. Cette réaction stabilise la séparation des charges.

#### **2.3.3.4 LE COMPLEXE COLLECTEUR DE LUMIÈRE DU PSII**

La taille d'une antenne du PSII implique environ 210 Chl, dont 50 sont intégrées au noyau du PSII, principalement dans les protéines CP 47 et CP 43 <sup>6</sup>. Les autres Chl, constituent les CCLII proximal et distal.

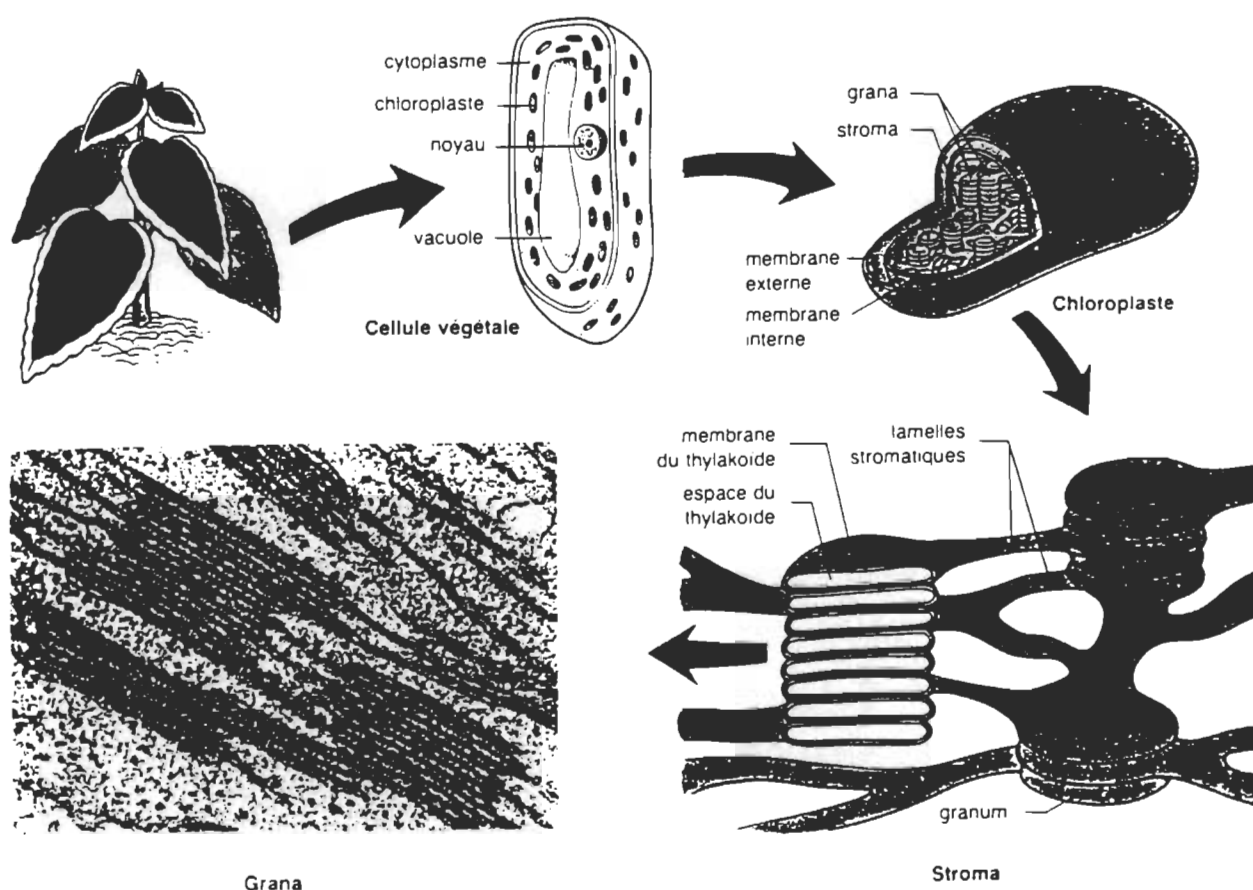
Le CCLII est le complexe pigment-protéine le plus abondant dans les thylacoïdes constituant 50 % des pigments impliqués dans la photosynthèse <sup>7</sup>. Il est également le principal composant de l'antenne collectrice de lumière du PSII. Le CCLII est un trimère de structure triangulaire où chaque sous-unité contient 12 molécules de Chl et 2 molécules de caroténoïdes, les lutéines. Ce complexe collecteur est connecté avec le centre réactionnel via d'autres protéines porteuses de Chl (protéines accessoires), la CP 24, CP 27 et la CP 29.

À part son hétérogénéité génétique et protéique, le CCLII possède aussi une hétérogénéité organisationnelle. Il est arrangé en deux sous-populations qui ont la même composition pigmentaire, mais différent dans leur contenu peptidique, leur degré de phosphorylation, leur fonction régulatrice, et leur connexion au noyau du PSII <sup>8</sup>. L'une des sous-populations est fortement liée au noyau du PSII tandis que l'autre sous-population est plus faiblement liée au PSII, et possède la caractéristique de se détacher des grana lorsque phosphorylé à cause d'un excès de stimulation du PSII, ce CCLII phosphorylé va se lier au PSI des lamelles stromatiques. C'est ce que l'on appelle respectivement le CCLII proximal et distal. Les premiers huit acides aminés du CCLII distal exposés à la surface stromatique de la membrane, constituent le site de phosphorylation de la kinase <sup>6</sup>.

## **2.4 STRUCTURE DU CHLOROPLASTE**

Le chloroplaste est constitué de deux membranes: l'une interne et l'autre externe (figure 2). La membrane interne s'invagine dans le chloroplaste pour former les membranes thylacoïdiennes. Elles sont classées en deux groupes selon leur empilements ou non : les thylacoïdes granaires ou grana qui forment des sacs aplatis et dont les membranes contiennent surtout les photosystèmes II (PSII) et les cytochromes  $b_6f$  (Cyt  $b_6f$ ), le deuxième groupe sont les lamelles stromatiques (région non-empilée) qui contiennent surtout les photosystèmes I (PSI), Cyt  $b_6f$  et l'ATP synthétase. À l'intérieur des thylacoïdes granaires et des lamelles stromatiques se trouve le

lumen, tandis qu'à l'extérieur de ceux-ci on retrouve le stroma qui contient l'ADN, les ribosomes et les enzymes nécessaires au cycle de Calvin (réduction du gaz carbonique en hexoses dans la phase sombre).



**FIGURE 2:**

Représentation schématique de la feuille, de la cellule végétale, du chloroplaste et des thylacoïdes. En bas à gauche, photomicrographie des grana (région empilée des thylacoïdes) <sup>9</sup>.

## 2.5 HÉTÉROGÉNÉITÉS DES PSI ET PSII

Selon les travaux d' Andreasson et Albertsson, les PSII et les PSI des thylacoïdes peuvent être séparés en deux populations:

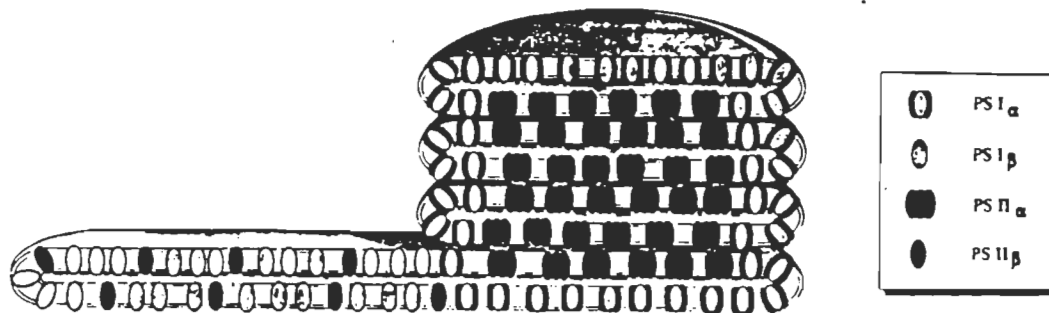
- Les  $\alpha$  venant des grana
- Les  $\beta$  venant des lamelles stromatiques

Les PSII $\alpha$  sont situés dans le centre des grana tandis que les PSI $\alpha$  sont localisés à la périphérie des grana (figure 3). Les PSII $\beta$  et les PSI $\beta$  sont distribués dans les lamelles stromatiques <sup>10, 11</sup>. La population  $\alpha$  possède un complexe antennaire plus gros par rapport à la population  $\beta$  qui a un complexe antennaire plus petit. Les deux complexes  $\alpha$  des grana sont responsables du transport d'e<sup>-</sup> oxygénique et de la réduction du NADP<sup>+</sup>, alors que les lamelles stromatiques avec leur deux systèmes  $\beta$  effectueraient la photophosphorylation cyclique<sup>10, 12, 13</sup>.

Les PSI $\alpha$  ont un complexe antennaire 40% plus large et contiendraient aussi plus de Chl b que les PSI $\beta$  <sup>10, 11</sup>. Les complexes  $\alpha$  seraient liés à un CCLII qui augmenteraient la taille de l'antenne. Le CCLII lié au PSI $\alpha$  consisterait en une sous-population différente de celle rencontrée pour le PSI $\beta$ . Le PSI $\beta$  serait connecté avec le CCLII mais de façon moindre <sup>11</sup>. On ne sait pas encore, si le CCLII associé au PSI $\alpha$  et PSI $\beta$  est phosphorylé ou non.



Pour les PSII, il a été proposé <sup>14</sup> que la dimension du complexe antennaire dans les chloroplastes des plantes supérieures pouvait changer en réponse à différentes conditions de lumière et que la population était hétérogène en dimension <sup>15</sup> ainsi que dans l'habilité à réduire la plastoquinone <sup>16</sup>.



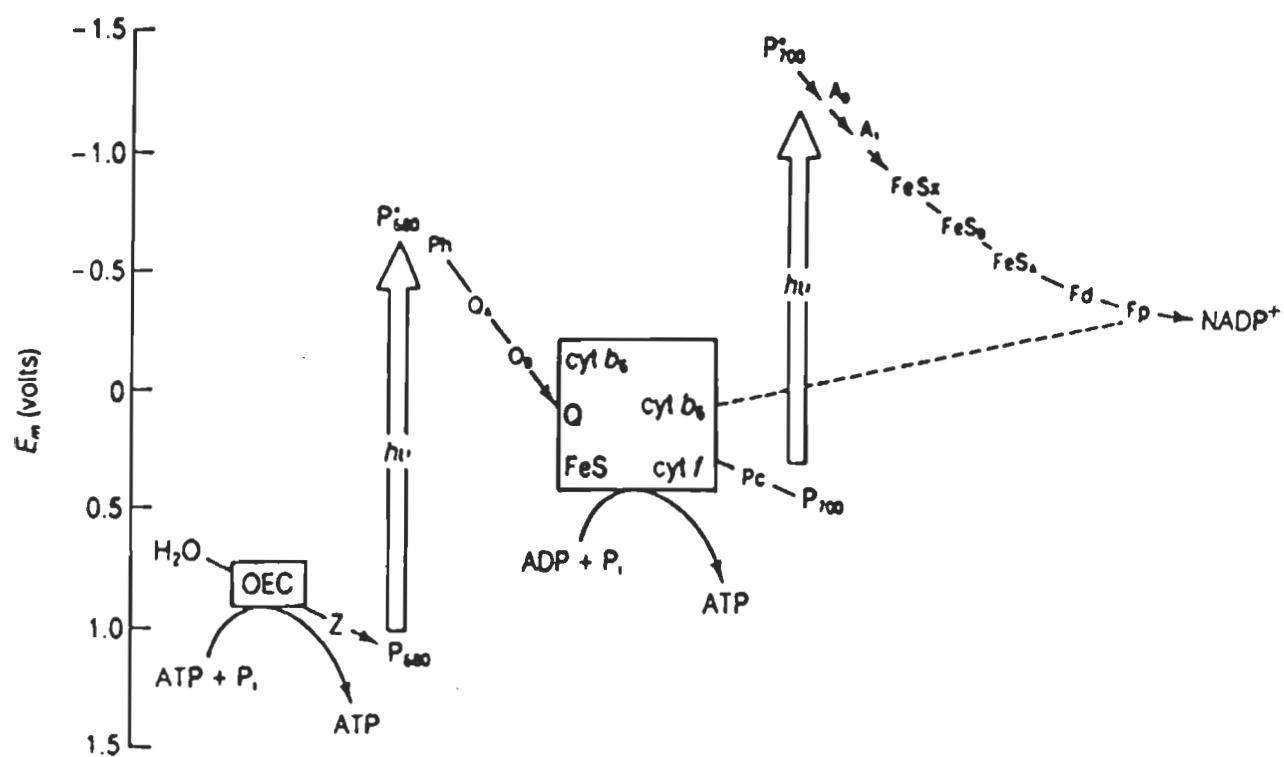
**FIGURE 3:** Modèle montrant la distribution des complexes  $\alpha$  et  $\beta$  <sup>10</sup>.



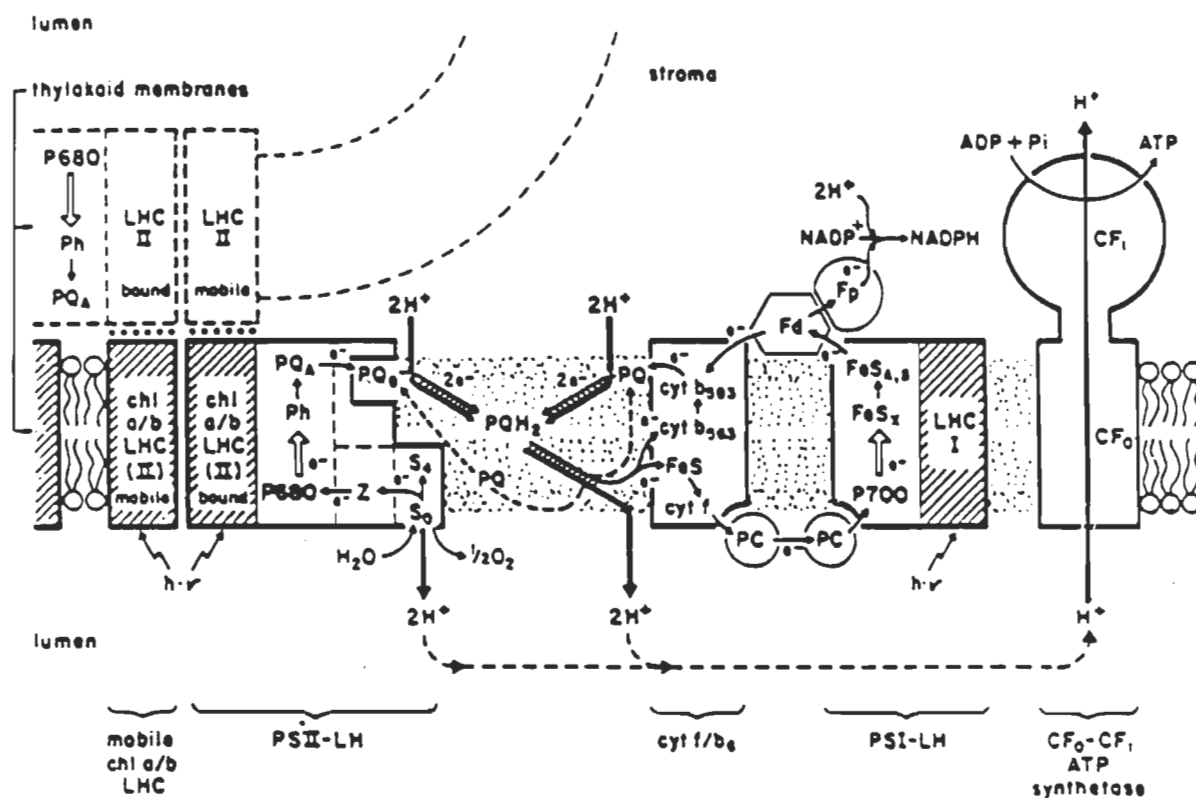
## 2.6 LE TRANSPORT D'ÉLECTRONS

La plupart des protéines du thylacoïde sont reliées à un des quatre complexes protéiques: le PSII, le Cyt  $b_6f$ , le PSI et l'ATP synthétase (figure 4). Ces complexes ont un arrangement asymétrique au sein de la bicouche lipidique de la membrane dans le but de fournir un transport vectoriel des  $e^-$  et une translocation de  $H^+$  à travers la membrane. Cette translocation de protons résulte à la formation du gradient de  $H^+$  nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthétase.

Le flux d'  $e^-$  linéaire dans la membrane photosynthétique implique trois de ces complexes qui sont dans l'ordre du transport d' $e^-$  (figure 5, 6) : (1) le PSII qui oxyde l'eau et fournit les  $e^-$  au côté réducteur de la membrane. (2) le Cyt  $b_6f$  qui occupe une position centrale dans la chaîne de transport en oxydant le plastoquinol ( $PQH_2$ ) et en réduisant la plastocyanine (PC). (3) le PSI qui achemine ses  $e^-$  à la ferrédoxine NADP $^+$  réductase (Fp) qui réduit le NADP $^+$  pour former le NADPH essentiel au cycle de Calvin (phase sombre). Le lien entre ces différents complexes se fait grâce à la mobilité latérale de deux navettes: le pool de plastoquinones (PQ) et la plastocyanine (PC).



**FIGURE 5:** Le schéma en Z de la photosynthèse oxygénique <sup>18</sup>.



**FIGURE 6:** Transport des électrons dans les thylacoïdes. Les flèches pleines et minces indiquent les réactions de transfert d' $e^-$ ; flèches ouvertes, transitions chimiques; flèches larges, mouvement des  $H^+$ ; flèches en pointillées, recyclage des PQ. Trois complexes protéiques participent dans le transport d' $e^-$  linéaire de l' $H_2O$  au NADPH: le PSII, qui est lié par le pool de PQ liposoluble au Cyt  $b_6f$  et la PC qui fait la navette entre le Cyt  $b_6f$  et le PSI <sup>19</sup>.

### 2.6.1 DU CENTRE RÉACTIONNEL DU PSII, LE P680, AU SITE Q<sub>B</sub>

Le PSII, est le point de départ de la chaîne de transport linéaire d' $e^-$ . L'énergie absorbée par les Chl des CCLII du PSII est transmise au centre réactionnel, P680. Les  $e^-$  venant du P680 sont transférés par la suite à la Phéophytine (Ph) ce qui constitue la séparation de charge, puis aux quinones A et B (Q<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub>).

La distance entre la Ph et le site de fixation de Q<sub>A</sub>, est de 13-14 Å<sup>20</sup> et le temps de demi-vie du transfert d' $e^-$  entre ces deux composantes, est 300-500 psec<sup>21</sup>. Le transfert d' $e^-$  se fait avec un  $t_{1/2}$  de 0.28 msec et 0.33 msec, respectivement pour Q<sub>A</sub><sup>-</sup> Q<sub>B</sub>/ Q<sub>A</sub> Q<sub>B</sub><sup>-</sup> et Q<sub>A</sub><sup>-</sup> Q<sub>B</sub><sup>-</sup> / Q<sub>A</sub> Q<sub>B</sub><sup>-</sup> - à pH 6.5<sup>22</sup>.

Après une double réduction par Q<sub>A</sub><sup>-</sup> et une double protonation, la PQH<sub>2</sub> se détache du site Q<sub>B</sub> et migre dans la membrane pour aller réduire le Cyt b<sub>6</sub>f. Le transfert de Q<sub>A</sub> à Q<sub>B</sub> se fait par l'intermédiaire d'un fer nonhémique qui est contrôlé par la forte liaison du bicarbonate entre Q<sub>A</sub> et Q<sub>B</sub>. Le transfert des  $e^-$  au complexe b<sub>6</sub>f dépend aussi de la présence du dioxyde de carbone.

### 2.6.2 LA PQ: NAVETTE MOBILE ENTRE LE PSII ET LE CYT B<sub>6</sub>F

L'existence de trois complexes protéiques transmembranaires, définissant la chaîne de transport d'e<sup>-</sup> implique l'intervention de transporteurs d'e<sup>-</sup> mobiles ou navettes, qui assureront la connexion entre eux. Les deux navettes du transport d' e<sup>-</sup> sont la PQ et la PC.

Les PQ ont une chaîne polyisoprénoïde de 10 atomes de carbones. La taille du pool dans les chloroplastes a été estimée à 40 molécules par P700 <sup>2 3</sup>. La capacité de cette longue chaîne de reconstituer la transduction de l'énergie est très bien corrélée avec la tendance de croire que les quinones résident au centre de la bicouche <sup>2 3</sup>. La grande taille du bassin de PQ, ainsi que la protonation et la déprotonation associées avec leurs oxydoréductions, conduisent à émettre la proposition du rôle central qu'occupent les quinones dans le mécanisme de la translocation de H<sup>+</sup>.

La navette entre le PSII et le Cyt b<sub>6</sub>f se fait par diffusion latérale de la PQ. Son mouvement dans la bicouche et le relâchement du PQH<sub>2</sub> du site Q<sub>B</sub>, peuvent impliquer l'existence d'un canal qui s'étend de la région centrale de la bicouche au site de Q<sub>B</sub>. Cependant, il est encore très probable que cette diffusion soit chaotique. Dans tous les cas, elle est cinétiquement compétente pour le transfert d'e<sup>-</sup> entre le PSII et le Cyt b<sub>6</sub>f.

### 2.6.3 LE COMPLEXE DU CYT B<sub>6</sub>F

Du point de vue fonctionnel, l'oxydation du PQH<sub>2</sub> se produit à travers le Cyt b<sub>6</sub>f, auquel il doit transitoirement se lier. Le site de liaison, au niveau du Cyt b<sub>6</sub>, forme une niche où vient se loger le PQH<sub>2</sub>. Cette oxydation est à l'origine de la réduction séquentielle de la protéine de Rieske, du Cyt f, de la PC et du centre réactionnel du PSI, le P700.

Le transport linéaire des e<sup>-</sup> montre que l'oxydation du PQH<sub>2</sub> par le Cyt b<sub>6</sub>f s'effectue avec un rapport H<sup>+</sup> transloqués / électrons transférés (H<sup>+</sup>/ e<sup>-</sup>) égal à 1. La réduction de la PC par le Cyt f, se produit avec un taux constant qui devrait être égal au taux d'oxydation du Cyt f <sup>25</sup>. La stoechiométrie du pool de PC est de 3-4 molécules par P700 et Cyt f <sup>26</sup>. La liaison électrostatique entre la PC et l'hème du Cyt f, dans la face luminale granaire, implique l'interaction de la Lys-187 du Cyt f avec l'Asp-44 chargée négativement de la PC <sup>27</sup>. Le Cyt b<sub>6</sub>f est constitué principalement de quatre polypeptides: le cytochrome f, le cytochrome b<sub>6</sub>, la protéine Fe-S de Rieske et la sous-unité IV, respectivement de 34, 23, 20 et 17 kDa <sup>24</sup>. Une autre sous-unité de faible masse, 4 kDa, représentant le produit du gène *petE* et nommée la sous-unité V a été décrite.



Le Cyt f serait une hélice  $\alpha$  hydrophobe transmembranaire où le domaine N-terminal, relativement polaire, s'étendrait dans le lumen des thylacoïdes et contiendrait le groupe hème lequel interagit avec catalyse avec la protéine Fe-S de Rieske <sup>28</sup>.

Les Cyt  $b_6$  ou  $b_5 63$ , au nombre de deux, dont un à haut potentiel redox et l'autre à faible potentiel, assurent le transport d' $e^-$  entre le stroma et le lumen de la membrane thylacoïdienne.

Le rôle de la protéine Fe-S de Rieske est encore incertain, mais pourrait être impliquée dans l'assemblage du Cyt  $b_6 f$ . Cette protéine existerait sous deux formes avec des  $pI$  différents de 5.1 et 5.4 dans les cytochromes d'épinards, mais leurs fonctions restent hypothétiques <sup>29</sup>.

Le Cyt  $b_6 f$  est localisé de façon homogène dans les membranes thylacoïdiennes, autant dans les grana que dans les lamelles <sup>30</sup>. Il sert de transporteur d' $e^-$  entre le PSII et le PSI par l'intermédiaire de la PQ et de la PC et agirait aussi comme une pompe à protons. De plus, il est impliqué dans le transport cyclique d' $e^-$ . Donc le Cyt  $b_6 f$  servirait d'oxydoréductase au complexe  $PQH_2$  et PC <sup>31</sup>.

#### 2.6.4 LA PC: NAVETTE ENTRE LE CYT $B_6F$ ET LE PSI

La PC est le second transporteur mobile d' $e^-$  dans les thylacoïdes. Le site de liaison de la PC dans le PSI est une protéine de 19-21 kDa produit par le gène *psa F*<sup>32</sup>, avec laquelle la PC se lie, près de son groupement redox à cuivre. Elle est alors oxydée et remplacée par une seconde molécule de PC réduite, dans un délai de 110  $\mu$ sec<sup>33</sup>.

Il n'est pas possible de faire une distinction entre le temps du transfert d' $e^-$  et le temps nécessaire pour la diffusion. Il apparaît que le temps caractéristique de la diffusion de la PC, du Cyt  $b_6f$  au PSI, est d'approximativement 300  $\mu$ sec.

La distance moyenne entre le Cyt  $b_6f$  et le PSI, a été estimée à 2000 et 200 Å dans la région granaire et lamellaire, respectivement<sup>26</sup>. Il a été proposé que la grande distance séparant le Cyt  $b_6f$  et le PSI dans la région granaire est compensée par une grande concentration de PC dans le lumen des chloroplastes illuminés<sup>26</sup>.

### 2.6.5 LE CENTRE RÉACTIONNEL DU PSI, LE P700

Le centre réactionnel du PSI (le P700), catalyse l'oxydation de la PC et la réduction de la ferrédoxine (Fd). Le système d'accepteurs d' $e^-$  du PSI est le plus compliqué de tous les centres réactionnels photosynthétiques avec cinq groupes prosthétiques différents. Dans l'ordre du transport d' $e^-$ , ces accepteurs sont  $A_0$ ,  $A_1$ ,  $[4Fe-4S]_X$  ( $F_X$ ) et  $[4Fe-4S]_A$  ( $F_A$ ) -  $[4Fe-4S]_B$  ( $F_B$ ). Les temps caractéristiques pour les événements du transfert d' $e^-$  primaire sont 15 psec pour  $P700 + A_0 \rightarrow P700^+ + A_0^-$ <sup>34</sup>, environ 40 psec pour  $A_0^- + A_1 \rightarrow A_0 + A_1^-$ <sup>35</sup> et 200 nsec pour l'oxydation de  $A_1^-$  par le centre  $[4Fe-4S]_X$ <sup>36</sup>. Il existe deux hypothèses pour l'oxydation du centre  $F_X$  : 1) le  $F_X$  est oxydé par  $F_A$  et ce dernier est oxydé par  $F_B$  ou 2) le  $F_X$  est oxydé par  $F_A$  et  $F_B$  simultanément. Il n'existe pas de temps caractéristique connu pour les réaction  $F_X \rightarrow F_A \rightarrow F_B$  ou  $F_X \rightarrow F_A - F_B$ .

Chez les plantes supérieures, la composition polypeptidique du PSI peut s'établir à une dizaine de protéines. Les différentes protéines peuvent être divisées en trois catégories principales<sup>37</sup>.

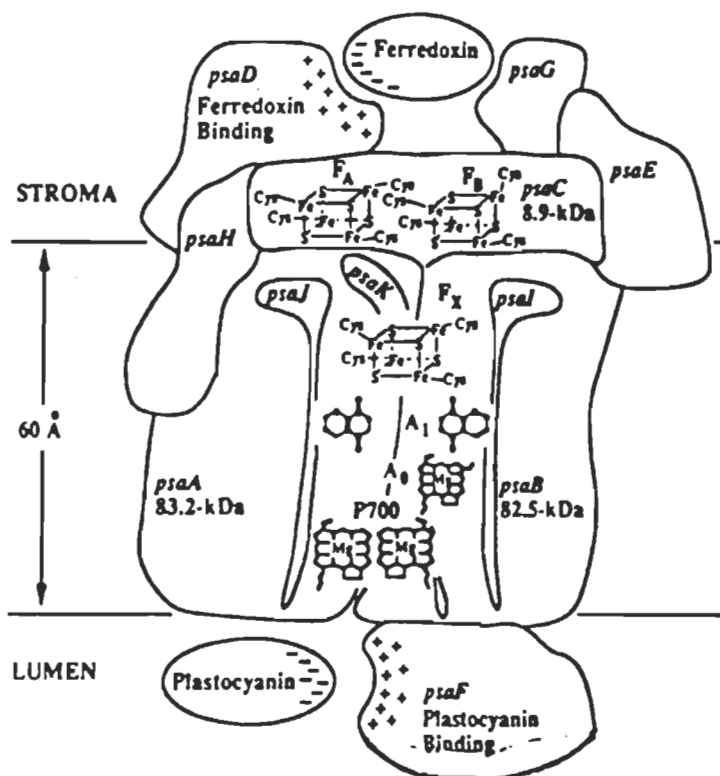
(1) Le noyau du centre réactionnel qui est constitué de deux classes de protéines. L'une est constituée par l'apoprotéine du P700 et l'autre par une protéine de 9 kDa riche en cystéines et qui lie les centres  $F_A$  et  $F_B$ .

(2) Trois ou quatre protéines périphériques dont le PM varie de 9 à 22 kDa et qui sont impliquées dans les interactions avec la Fd et la PC.

(3) Les polypeptides de 22 à 29 kDa associés au CCL du PSI (CCLI). Cette antenne du PSI lie environ 100 Chl a et b.

Le PSI natif contient environ 200 Chl dans son noyau et son antenne périphérique. Il est constitué par le P700, les accepteurs A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, F<sub>X</sub>, F<sub>A</sub>, F<sub>B</sub> ainsi que par le CCLI.

Le complexe du PSI est constitué d'une dizaine de sous-unités polypeptidiques dont cinq sont codées par le chloroplaste et six par le noyau. Les différentes protéines sont démontrées dans la figure 7.



**FIGURE 7:** Organisation du PSI <sup>18</sup>.

Le *psa A* et le *psa B* sont les deux gènes qui codent pour deux protéines homologues de PM de 83.2 et 82.5 kDa respectivement. Ces deux polypeptides forment un hétérodimère qui contient le centre réactionnel (P700), les accepteurs  $A_0$  et  $A_1$ , ainsi que le centre Fe-S, Fx.

Les centres  $F_A$  et  $F_B$  sont localisés sur une protéine de 8.9 kDa codée par le gène *psa C*. Cette protéine contient huit atomes de Fer et de Soufre, car ces deux centres sont  $4Fe-4S$  <sup>38</sup>.

Le gène *psa D* code pour la sous-unité de 22 kDa qui interagit avec la Fd. Cette dernière est une protéine extrinsèque localisée du côté du stroma de la membrane thylacoïdienne. Cette protéine possède plusieurs sites positifs qui auraient pour fonction de neutraliser les charges négatives de la Fd afin que celle-ci puisse interagir avec le PSI, malgré les charges négatives de la surface membranaire des thylacoïdes.

La PC interagit avec une sous-unité de 19 kDa codée par le gène *psa F*. La présence de charges positives sur cette protéine permet la stabilisation des charges négatives de la PC, afin de ne pas être repoussée par la surface négativement chargée <sup>39</sup>. La PC et la Fd sont localisées respectivement dans le lumen et le stroma des thylacoïdes.

La Fd est une protéine soluble  $[2Fe-2S]$  qui s'occupe du transfert d' $e^-$  entre le PSI et la ferrédoxine NADP<sup>+</sup> réductase (Fp). La Fd possède deux domaines distincts chargés négativement de chaque côté du centre  $[2Fe-2S]$ . Le site de liaison de la Fp serait localisé sur les

deux sites chargés négativement de la Fd. Ainsi les domaines chargés contrairement de la Fd et de la Fp, s'unissent pour former une liaison électrostatique <sup>40</sup>.

#### **2.6.6 LA RÉDUCTION DU NADP**

La protéine non-hémique [2Fe-2S], la ferrédoxine, et la flavoprotéine - FAD, la ferrédoxine NADP<sup>+</sup> réductase (Fp), assurent le transport d'e<sup>-</sup> du côté réducteur du PSI à partir des centres [4Fe-4S]<sub>A,B</sub> jusqu'à la réduction du NADP<sup>+</sup> en NADPH. Ce dernier va, avec le CO<sub>2</sub>, amener la formation d'hexoses par le cycle de Calvin qui se déroule dans la phase sombre. Il existe deux enzymes de ferrédoxine dans les chloroplastes d'épinard; la Fd I de PM de 10.5 kDa avec un seul groupement [2Fe-2S] et l'enzyme Fp constituée de 314 acides aminés.

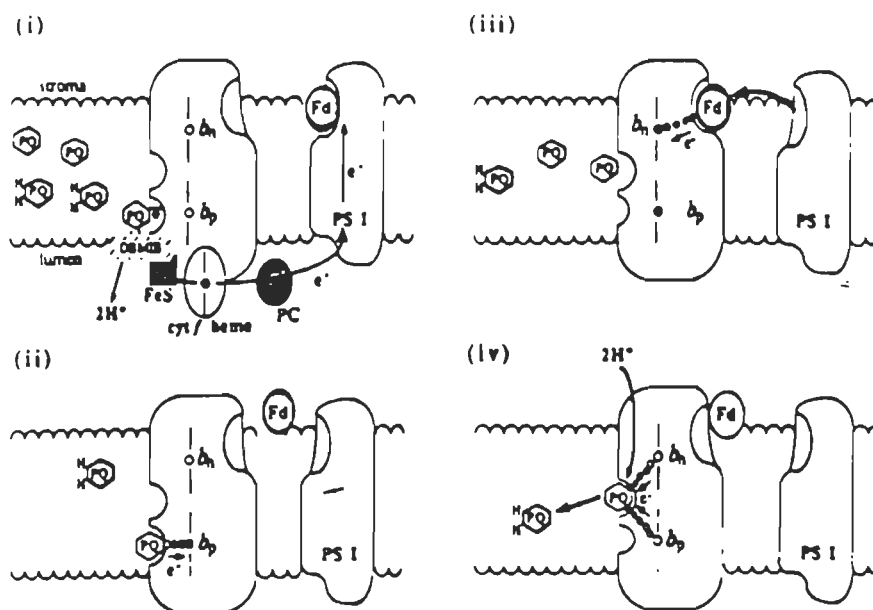
Le transfert d'e<sup>-</sup> de la Fd à la Fp est produite par l'interaction électrostatique entre des résidus de la Fd chargés négativement et des résidus de la Fp chargés positivement. Les modifications chimiques des résidus carboxylés de la Fd inhibent sa complexation avec la Fp, mais n'affectent pas la capacité de la Fd d'être réduite par le PSI <sup>41</sup>. La Fp contient des sites de liaisons séparés pour la Fd et le NADP<sup>+</sup>, comme il est démontré par la formation d'un complexe, Fd-Fp-NADP<sup>+</sup>.

### 2.6.7 RÉGULATION DU TRANSPORT LINÉAIRE ET CYCLIQUE D'ÉLECTRONS

Le flux d' $e^-$  à partir du CDO du PSII, jusqu'à  $\text{NADP}^+$  via le PSI est connu comme le transport linéaire d'électrons. Ce chemin peut être supplémenteé d'un transport cyclique d' $e^-$  dans lequel la Fd transfère ses  $e^-$  au Cyt  $b_6$  dans le complexe du Cyt  $b_6f$ . Le retour du transport d' $e^-$  au P700 se produit alors via la PQ et le Cyt f (figure 8). Ce flux d' $e^-$  est couplé à la synthèse d'ATP via la production d'un gradient électrochimique de  $\text{H}^+$  du à l'oxydoréduction de la PQ.

Le flux linéaire des  $e^-$  devrait passer en priorité sur le processus cyclique si la Fd réduit préférentiellement le  $\text{NADP}^+$  au lieu du Cyt  $b_6$ . En théorie, le rapport entre la concentration d'ATP et la production du NADPH par le transport linéaire d' $e^-$  est de 3 : 2. Ceci est approprié pour la fixation d'une molécule de  $\text{CO}_2$  nécessaire à la formation d'hexoses, par le cycle de Calvin. Une augmentation du transport cyclique d' $e^-$  devrait augmenter la synthèse d'ATP. Cependant le transport linéaire d' $e^-$  peut ne pas fournir l'ATP et le NADPH dans un rapport 3:2 précisément et le flux cyclique d' $e^-$  apporterait alors la flexibilité requise pour obtenir ce rapport.

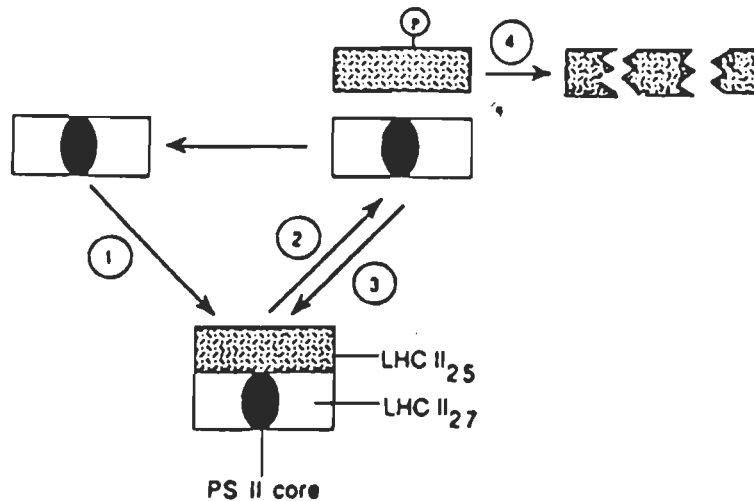




**FIGURE 8:** Mécanisme du transport cyclique des  $e^-$  impliquant l'arrangement transmembranaire de deux hèmes du Cyt b<sub>6</sub>. (i) Le transfert d'un  $e^-$  dans le PSI réduit la Fd et oxyde PQH<sub>2</sub> en semi-quinone PQ $^{\cdot-}$ . (ii) La réduction de l'hème b<sub>L</sub> par PQ $^{\cdot-}$ . (iii) La réduction simultanée de l'hème b<sub>H</sub> par la Fd réduite. (iv) L'oxydation coopérative des deux  $e^-$  des deux hèmes par PQ, formant PQH<sub>2</sub> et complétant le cycle <sup>18</sup>

Les mécanismes de régulation peuvent altérer la balance entre le transport d' $e^-$  dans les deux photosystèmes. Il est connu que, lors d'une excitation excessive, la PQ est sur-réduite par le PSII. Alors, une kinase liée à la membrane est activée. Cette kinase phosphoryle rapidement une protéine périphérique du CCLII et

provoque une augmentation des charges négatives qui forcent quelques uns de ces CCLII à se dissocier du PSII et migrer latéralement aux régions des lamelles stromatiques du thylacoïde où le PSI est localisé (figure 9). Ceci altère la distribution de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes, réduisant l'énergie passée au PSII. L'augmentation de l'excitation du PSI peut alors favoriser le flux cyclique des  $e^-$ . Ces changements peuvent se produire en un temps très court, 20 sec, et sont connus sous le nom de transitions d'états <sup>42</sup>.



**FIGURE 9:** Schéma de la phosphorylation des CCLII

## **2.7 L'ATP SYNTHÉTASE ET LE COUPLAGE ÉNERGÉTIQUE**

L'ATP nécessaire pour le cycle de Calvin est produite au cours de la phase lumineuse. L'ATP synthétase utilise le gradient de protons formé de part et d'autre de la membrane lors du transport d'électrons.

### **2.7.1 LE COMPLEXE CF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>**

L'ATP synthétase (figure 10), ou CF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>, est localisé dans les lamelles stromatiques et les régions exposées des empilements granairens. Il est formé de deux parties distinctes morphologiquement et fonctionnellement. Une partie hydrophile, F<sub>1</sub>, qui émerge de la membrane et contient les sites catalytiques responsables de la synthèse et/ou l'hydrolyse d'ATP. Elle consiste en cinq sous-unités différentes, désignées par  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , et  $\epsilon$  dans l'ordre des poids moléculaires décroissants. L'autre partie, F<sub>0</sub>, est hydrophobe et donc insérée dans la bicouche lipidique. Elle agit comme un canal de protons, permettant le rétablissement du gradient électrochimique photoinduit. Elle est constituée de quatre sous-unités nommées I, II, III et IV.

Le transport des  $e^-$  induit par la lumière est couplé à un pompage des protons à travers la membrane du côté stromal vers le



La figure 10, illustre un modèle membranaire basé sur de récentes données sur le transfert d' $e^-$  et le flux de protons. Ce flux peut être soit localisé dans la membrane, il se présente donc une barrière avec la phase luminale; soit transmembranaire, il est dit alors délocalisé et les protons de la membrane sont en équilibre avec ceux du lumen. On ne sait pas encore quelles sont les structures physiques qui constituent les domaines localisés liés aux protons. La figure 10 illustre une possibilité qui reste cependant très spéculative: les parties des protéines intrinsèques exposées au lumen telles que le CCLII et certaines protéines extrinsèques du côté luminal tel que le CDO peuvent créer un espace entre les têtes polaires de la bicouche lipidique et la masse de protéines alignées sur la face luminale.

Les protons acheminés dans ce canal interne peuvent s'équilibrer à tout moment avec les protons de la phase aqueuse. Les conditions qui déplacent le mode du couplage, du localisé au délocalisé (et vice versa), sont contrôlées par les concentrations ioniques des phases aqueuses. L'hypothèse avancée pour ce déplacement est que le  $Ca^{+2}$  peut se fixer sur un site spécifique de la barrière du canal du flux des  $H^+$  du côté luminal de la membrane et le gradient du couplage énergétique est maintenu dans le mode localisé. Le déplacement de la liaison  $Ca^{+2}$  provoque l'ouverture de la barrière et le déversement des protons dans le lumen conduisant au mode de couplage énergétique délocalisé. Ce modèle indique aussi que les

chloroplastes tendent à adopter le mode localisé du couplage probablement, à cause de leur haute concentration en  $\text{Ca}^{+2}$  <sup>4 3</sup>.

Le mode de couplage localisé peut avoir plusieurs avantages physiologiques: (1) la formation rapide du gradient électrochimique de  $\text{H}^+$ , (2) l'osmorégulation du volume du thylacoïde, (3) la régulation de l'acidification du lumen, (4) l'équilibration des  $\text{H}^+$  avec ceux du lumen dans les conditions limitant la formation d'ATP; la protonation des groupes carboxyles de la barrière provoque le déplacement du  $\text{Ca}^{+2}$  et l'ouverture du canal et (5) le contrôle de la déépoxydation des violoxanthines. Le pH du lumen peut avoir un effet très prononcé sur l'enzyme violoxanthine déépoxydase, connu pour être actif a pH 5.2, et qui permet la conversion des violoxanthines en zéaxanthines. La concentration de violoxanthines est influencée par le mode de couplage, soit localisé (violoxanthines moins disponibles) ou soit délocalisé (violoxanthines plus disponibles). Cette conversion est d'une grande importance physiologique si on considère le rôle capital que jouent les zéaxanthines dans le processus de la dissipation non-radiative de l'excès de l'énergie lumineuse absorbée par les plantes. En présence du couplage énergétique délocalisé, les zéaxanthines vont être formés en permanence, ce qui provoquerait en cas de lumière non excessive, une perte inutile de l'énergie emmagasinée. Le couplage localisé pourrait éviter la stimulation de l'enzyme violoxanthine déépoxydase et permettre ainsi une utilisation efficace de la lumière absorbée.

## **2.8 LE PHOTOSYSTÈME II**

Comme le présent travail implique l'utilisation de fragments membranaires enrichis en PSII, ce photosystème sera décrit en détail. Le PSII est un complexe de pigments-protéines composé de plus de vingt protéines différentes, de pigments et d'ions inorganiques tels que le  $\text{Ca}^{+2}$  et le  $\text{Cl}^{-}$  (figure 11). L'énergie lumineuse est capturée par les Chl du CCLII pour être acheminée vers la chlorophylle spéciale P680 dans le centre réactionnel où la séparation de charges induira le transport des  $e^{-}$ . Le PSII prend toute son importance par le fait qu'il est responsable de l'oxydation de l'eau.

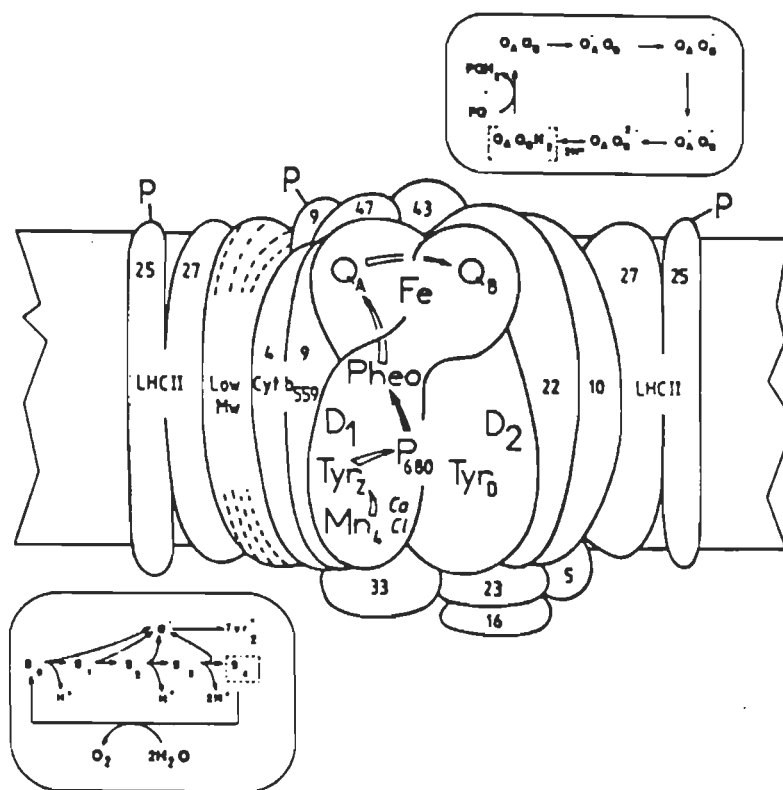
### **2.8.1 L'HÉTÉRODIMÈRE D1/D2**

Les protéines D1 et D2, de PM de 32 et 34 kDa respectivement, qui constituent le noyau du PSII sont homologues <sup>44</sup> aux sous-unités L et M des bactéries photosynthétiques pourpres. Les similarités fonctionnelles entre le centre réactionnel du PSII et celui des bactéries pourpres ont conduit à la détermination des résidus d'acides aminés fonctionnels spécifiques <sup>45</sup>. Les plus importants de ces résidus sont His-198, His-215, His-272 et His-269, probablement à cause de leur liaison avec le P680 et l'His-190 et 332 qui seraient possiblement des ligands pour le Mn <sup>46</sup>.

D'autre part, deux résidus tyrosines, Tyr-161 de D1 et Tyr 161 de D2, ont été identifiés comme Tyr Z et Tyr D, respectivement, <sup>47</sup> dont la fonction est le transfert d' $e^-$  du côté donneur du PSII; TyrZ est le réducteur immédiat du P680. L'hétérodimère D1/D2 dans le PSII natif contient aussi la phéophytine (Ph ou Pheo), accepteur primaire du P680, ainsi que les accepteurs secondaires, les quinones A et B ( $Q_A$  et  $Q_B$ ) respectivement fixées sur D2 et D1 (figure 11).

Cet hétérodimère contient le centre réactionnel (le P680), qui est un dimère de Chl a <sup>48</sup>. Le P680 a la propriété spéciale de séparation de charges, c'est à dire que le  $P680^*$  (état excité) va perdre 1  $e^-$  pour devenir  $P680^+$ . Pour revenir à son état initial, le  $P680^+$  va oxyder la TyrZ, qui prend ses  $e^-$  de l'oxydation de l' $H_2O$  par le CDO. L'hétérodimère serait aussi responsable de la fixation des quatre Mn responsables du rôle catalytique du CDO.





**FIGURE 11:** Modèle schématique du PSII montrant le transport des  $e^-$  ainsi que les états d'oxydation de l'eau ( $S_0$ - $S_4$ )<sup>18</sup>.

### 2.8.2 LE CYTOCHROME B-559

Le cytochrome b-559 (Cyt b-559) est constitué de deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$  de PM de 9 kDa et 4.5 kDa, respectivement, et est intimement associées au centre réactionnel (D1 et D2) du PSII.

Il existe deux types de Cyt b-559, selon leur potentiel: le premier type à faible potentiel ( $E = 60-80$  mV) appelé Cyt b-559LP et le second à haut potentiel ( $E = 400$  mV) ou Cyt b-559HP<sup>49</sup>. Le rôle du Cyt b-559 LP et HP serait de protéger le PSII contre les dommages causés par la photoinhibition du côté donneur ou accepteur d'électrons<sup>49, 50, 51</sup>.

La photoinhibition du côté donneur d' $e^-$  survient quand le taux d' $e^-$  qui quittent le P680 est plus grand que le taux d' $e^-$  venant du CDO, ce qui fait que le  $P680^+$  va avoir un temps de vie supérieur et étant un oxydant puissant entrainera la dégradation de D1. Ce type de photoinhibition est remarqué quand le CDO est inhibé. La photoinhibition du côté accepteur d' $e^-$  se déroule quand il y a surréduction de QA qui devient ainsi  $QA^{--}$ <sup>52</sup> ce qui fait qu'on augmente la probabilité de recombinaison entre la P680 et le  $P680^+$ , ce qui amène la formation de P680 à l'état triplet. Ce dernier peut réagir avec l' $O_2$  et former de l'oxygène singulet qui induira la protéolyse de D1<sup>53</sup>.

Le Cyt b-559LP peut accepter les  $e^-$  directement de la Ph réduite et ainsi cette forme agit comme un accepteur d' $e^-$ . En acceptant les  $e^-$  de la Ph on réduit le risque de dommage causé par la recombinaison entre  $P680^+$  et  $Ph$ . Le Cyt b-559HP protège le PSII contre la photoinhibition du côté donneur d' $e^-$ , car il peut être oxydé quand le CDO est inactivé <sup>49</sup>.

Il a été démontré <sup>49</sup> qu'il peut exister un changement réversible entre les deux formes de Cyt b-559 (HP, LP) afin de protéger le PSII contre la photoinhibition venant soit du côté accepteur ou donneur d' $e^-$ . Le Cyt b-559 existe in vivo principalement (75 %) sous la forme de haut potentiel (Cyt b-559HP) <sup>49, 50</sup>.

### **2.8.3 LES PROTÉINES EXTRINSÈQUES: 33, 24 ET 16 kDa**

Les protéines extrinsèques du PSII, au nombre de trois, de PM de 33, 24 (23) et 16 kDa sont responsables du fonctionnement optimal du CDO à la face lumentale des thylacoïdes.

### 2.8.3.1 LA PROTÉINE DE 33 kDa

La protéine de 33 kDa ou la protéine stabilisatrice du Mn a un pI de 5.1 et contient une quantité substantielle de Lysine <sup>54</sup>. Cette protéine stabilise deux des quatre atomes de Mn formant le centre catalytique pour le dégagement d'O<sub>2</sub> et accélère les états d'oxydations de l'eau de S<sub>3</sub> à S<sub>0</sub> <sup>55</sup>.

La 33 kDa est fortement associée avec la partie intrinsèque du PSII où elle interagit avec D1, D2, Cyt b-559 et la CP47, ce qui fait que pour l'enlever, des traitements avec des hautes concentrations de Tris alcalin (pH 8), CaCl<sub>2</sub> 1 M, MgCl<sub>2</sub> 1 M ou Urée 2.6 M sont nécessaires <sup>54, 55, 56</sup>.

Il a été démontré que la 33 kDa est requise pour la liaison d'au moins 2 Mn au PSII, mais un traitement avec CaCl<sub>2</sub> 1 M ne provoque pas la perte de ces 2 Mn: l'addition de cette protéine réactive l'activité du dégagement d'O<sub>2</sub> <sup>57</sup>. Lorsque la 33 kDa est absente, les états d'oxydations S<sub>3</sub> à S<sub>4</sub> sont inhibés et un faible taux de dégagement d'O<sub>2</sub> est observé <sup>58</sup>. Il a été observé que cette protéine peut se lier au PSII même en absence du Mn ce qui implique que le Mn n'est pas nécessaire à la liaison de la 33 kDa au complexe du PSII <sup>55</sup>. Après des traitements pour enlever cette protéine le complexe du PSII

n'est plus actif du côté du dégagement d'O<sub>2</sub> mais il garde cependant sa capacité de séparation de charges au niveau du P680 <sup>59</sup>.

Les rôles de cette protéine connus jusqu'à maintenant sont: (i) stabiliser le complexe de Mn, (ii) accélérer les transitions des états S de S<sub>3</sub> à S<sub>0</sub>, (iii) réduire le besoin en Cl<sup>-</sup> de 200 mM à 30 mM, (iv) procure un site de liaison pour la protéine de 24 kDa <sup>59, 62, 76</sup>.

### **2.8.3.2 LA PROTÉINE DE 24 kDa**

La protéine de 24 (ou 23) kDa a un pI de 6.5 et est enlevée par des traitements utilisant des forces ioniques élevées, le plus communément utilisés est le NaCl à des concentrations supérieures à 2 M <sup>54</sup>. Ce traitement enlève aussi la protéine de 16 kDa et résulte en une perte d'environ 90 % de la capacité de dégagement d'O<sub>2</sub> et une diminution de la reréduction de Z<sup>+</sup>; mais cependant l'addition de Ca<sup>2+</sup> <sup>60</sup> et de Cl<sup>-</sup> <sup>61</sup> au milieu peut partiellement restorer l'activité <sup>54</sup>. Des expériences de reconstitution avec la 24 kDa indique que cette protéine aurait deux sites de liaison; un à la protéine de 33 kDa et l'autre aux protéines intrinsèques du PSII <sup>2</sup>. On sait cependant que l'enlèvement de ce polypeptide est indépendant de l'enlèvement de la protéine de 33 kDa <sup>62, 76</sup>.

Les rôles de cette protéine seraient: (i) piéger le  $\text{Ca}^{+2}$  dans la partie intrinsèque du PSII, (ii) réduire le besoin en  $\text{Cl}^-$  de 30 mM à 10 mM, (iii) procurer un site de liaison pour la protéine de 16 kDa<sup>54, 55</sup>.

#### **2.8.3.3 LA PROTÉINE DE 16 kDa**

La 16 kDa est une protéine basique avec un pI de 9.2 et peut être extraite avec les mêmes traitements que la 24 kDa, cependant des plus faibles concentrations de sels sont requises pour son enlèvement<sup>54</sup>.

Les rôles de la 16 kDa seraient de: (i) maintenir le dégagement d' $\text{O}_2$  à des faibles concentrations de  $\text{Cl}^-$  et (ii) retenir le  $\text{Cl}^-$  au site actif du CDO<sup>54, 55</sup>.

Les rôles des 2 protéines de 24 et 16 kDa sont plutôt secondaires par rapport aux rôles de la 33 kDa, mais plusieurs données démontrent une relation étroite entre ces 2 protéines, le  $\text{Ca}^{+2}$  et le  $\text{Cl}^-$ . Ces ions sont reconnus comme des cofacteurs essentiels pour le dégagement d' $\text{O}_2$ . Ces 2 protéines produiraient une condition ionique appropriée ou un environnement pour le dégagement d' $\text{O}_2$  en concentrant ces ions essentiels près du site catalytique<sup>2</sup>.

Il y aurait deux hypothèses quant à l'arrangement spatial des trois protéines extrinsèques: (1) la liaison de la protéine extrinsèque altère la conformation de la partie intrinsèque du PSII pour créer le site de liaison pour la protéine extrinsèque suivante et (2) la conformation d'une protéine extrinsèque est modifiée dans sa forme liée dans le but de procurer un site de fixation pour la protéine suivante sur cette même protéine <sup>55</sup>

#### **2.8.4 LES COFACTEURS INORGANIQUES DU CDO**

Les différents cofacteurs importants pour le PSII sont: le calcium, le chlore et le manganèse. Les Mn, au nombre de quatre, jouent un rôle important car ils assurent la fonction catalytique du CDO et sont responsables des états d'oxydations de l'eau ou des états S de  $S_0$  à  $S_4$ . Pendant les changements des états S, des réactions d'oxydoréduction se déroulent au niveau des Mn. Les électrons arrachés par le site catalytique du CDO fourniront les électrons nécessaires au transport d'électrons au niveau des thylacoïdes.

Le Cl<sup>-</sup> joue un rôle important au niveau du CDO soit en (1) se liant avec le Mn afin de faciliter le transfert d'électrons parmi les atomes de Mn ou (2) en occupant un site dans le voisinage du Mn sans aucune liaison entre eux <sup>54, 63</sup>.

Après la perte de l'ion  $\text{Cl}^-$ , le PSII perd de l'activité et la restauration de l'activité peut être produite par l'ajout d'ions suivant l'ordre suivant:  $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^-$  <sup>54</sup>. Le PSII contiendrait de 4 à 5  $\text{Cl}^-$  au niveau du CDO <sup>54</sup>.

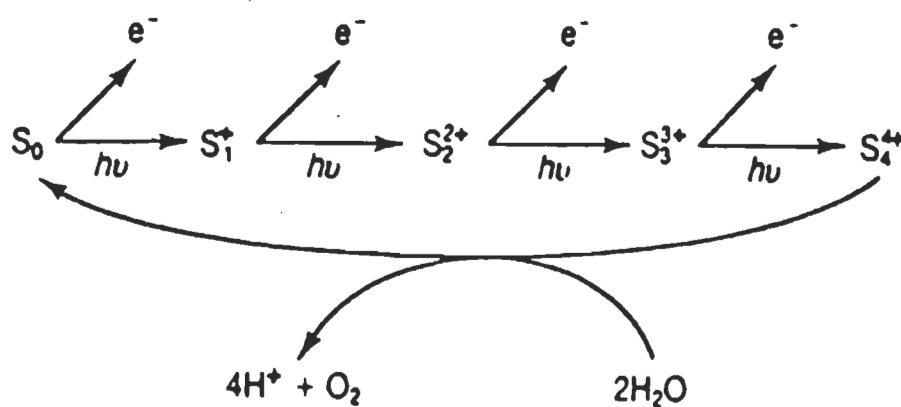
Le  $\text{Ca}^{+2}$  est un cofacteur indispensable pour le cycle normal d'oxydation de l'eau. La capacité de dégagement d' $\text{O}_2$  est perdue après des traitements qui provoquent le relâchement du  $\text{Ca}^{+2}$  du PSII <sup>64</sup>. Pour les CDO dépourvus de  $\text{Ca}^{+2}$ , les propriétés fonctionnelles et structurales des Mn sont modifiées. Cela impliquerait le bris de la liaison de coordination entre les atomes de Mn et leurs ligands. Le site de liaison du calcium est localisé dans les protéines intrinsèques du centre réactionnel et/ou au niveau de la protéine extrinsèque de 33 kDa <sup>54</sup>.



### 2.8.5 FONCTION DU COMPLEXE DE DÉGAGEMENT D'OXYGÈNE

La  $\text{Tyr}_Z^+$  est réduite par les électrons qui proviennent du CDO. À partir de considérations thermodynamiques, le mécanisme de l'oxydation de l'eau semble impliquer soit l'oxydation de quatre Mn ou soit deux oxydations séquentielles de deux Mn avec l'utilisation d'un intermédiaire peroxydé <sup>6 5</sup>. Le dernier mécanisme est considéré être le plus probable.

Les différents états redox du système de clivage de l'eau sont appelés les états S (figure 12 ):



**FIGURE 12:** Les états redox du dégagement d' $O_2$  et des ions Mn.

L'état le plus réduit,  $S_0$ , est converti par l'oxydation à partir d'un électron, en un état stable à l'obscurité.  $S_2$  et  $S_3$  sont formés par le transport net d'un, puis de deux électrons à travers le PSII. Après l'extraction d'un électron additionnel de  $S_3$ ,  $S_4$  est formé, il est instable et donc c'est lui qui relâche l' $O_2$ . Le système retourne instantanément à l'état  $S_0$ . Ce mécanisme semble impliquer l'oxydation de forme protonnée comme  $OH^\cdot$  ou de  $O_2^-$  formés par l'échange des molécules d'eau en dérivés  $\mu_2$ -oxo. Il semble être aussi couplé aux changements du pKa de ces dérivés  $\mu_2$ -oxo ou de ceux des autres groupes protonnables associés au complexe des Mn, ce qui fait que l'oxydation de l'eau est accompagnée par un largage de  $H^+$  <sup>6 6</sup>.

Le mécanisme de l'oxydation de l'eau reste à l'état hypothétique; plusieurs modèles ont été proposés au fil des années. Ils sont tous basés sur la conformation tétranucléique des atomes de Mn. Il a été même proposé que le complexe Mn subit des réarrangements structuraux durant les transitions  $S_2$ - $S_3$  et  $S_4$ - $S_0$ . En fait, l'état de protonation des ligands  $\mu_2$ -oxo influence fortement la réactivité, le potentiel redox et les propriétés magnétiques du complexe Mn et peuvent affecter la nucléarité. Par conséquent, les facteurs qui influencent les valeurs du pKa des dérivés  $\mu_2$ -oxo et le pH au voisinage du groupement Mn sont sensés profondément influencer l'oxydation de l'eau <sup>6 6</sup>.

### **3- LES POLYAMINES**

Chez les vivants, les polyamines ( PA ) jouent un rôle très important. Du point de vue biochimique, ce terme désigne les molécules organiques qui possèdent plusieurs fonctions amines.

Les polyamines sont des cations organiques produits par la décarboxylation des acides aminés basiques. Les polyamines que nous pouvons identifier chez les plantes, les animaux et les bactéries sont la putrescine (PUT), la spermine (SPM) et la spermidine (SPD)<sup>3</sup>. Les polyamines sont principalement associés au développement et la croissance des plantes. Par exemple, ils assurent la division cellulaire, l'embryogénèse, la formation des racines, la floraison, le pollen et le développement des fruits. Également, ils sont considérés comme une hormone ou un second messenger parce qu'ils ont des effets physiologiques dans le développement des plantes à de faibles concentrations <sup>68</sup>.

Les polyamines se retrouvent sous trois formes différentes : la forme libre, la forme conjuguée avec des petites molécules telles que l'acide phénolique et la forme liée avec des macromolécules comme les acides

nucléiques et les protéines<sup>3</sup>. Le mécanisme d'action serait basé sur la charge globale du polycation et sur son interaction probable avec les macromolécules biologiques chargées négativement telles que les protéines, les acides nucléiques et les phospholipides. L'interaction des différents polyamines avec les molécules biologiques pourraient constituer des mécanismes de régulation de processus de bases variées.

Les polyamines peuvent interagir avec des macromolécules biologiques, tel que les acides nucléiques, les protégeant de la dénaturation par la chaleur. En effet, les PA, chargés positivement, neutralisent les charges négatives des groupements phosphates des acides nucléiques<sup>69</sup>. Il y aurait possiblement un lien entre l'augmentation de la synthèse d'ARN et l'élévation du taux de polyamines dans la cellule<sup>69</sup>. Les PA peuvent se lier aux ribosomes aussi bien que le  $Mg^{+2}$ . Ils facilitent l'association des sous-unités ribosomiques, favorisant ainsi une synthèse active des protéines. Le taux de PA in vitro peut avoir un effet sur le taux de synthèse protéique à des étapes précises : la synthèse de l'aminoacyl-ARNt, sa liaison et l'initiation ou l'élongation de la chaîne polypeptidique<sup>69</sup>.

En ce qui concerne la synthèse des polyamines (voir figure 13), la formation de ces deux molécules provient d'un précurseur commun le diaminobutane ou putrescine <sup>69</sup>. L'adenosyl méthionine décarboxylé perd un bout de sa chaîne linéaire (portion encadrée) qui se fusionne avec la putrescine grâce à l'enzyme spermidine synthétase, formant ainsi la SPD. Une autre molécule, d'adenosyl méthionine subit le même sort. Cependant, elle fusionne sa partie linéaire sur la SPD formant ainsi la SPM sous l'action enzymatique de la spermine synthétase <sup>69</sup>.

Le précurseur commun, la putrescine, est synthétisé à partir de deux voies métaboliques différentes : soit par l'ornithine qui est décarboxylée par l'ornithine décarboxylase ou par l'arginine qui est décarboxylée par l'arginine décarboxylase formant l'agmatine. Cette dernière perd de l'urée formant le précurseur commun <sup>69</sup>.

La méthionine, grâce à une réaction catalytique avec le  $Mg^{+2}$  et l'ATP, formera le S-adénosyl méthionine. Puis l'adénosyl méthionine décarboxylase décarboxylera celle-ci formant l'adénosyl méthionine décarboxylée, molécule importante dans la synthèse de SPM et SPD <sup>69</sup>.

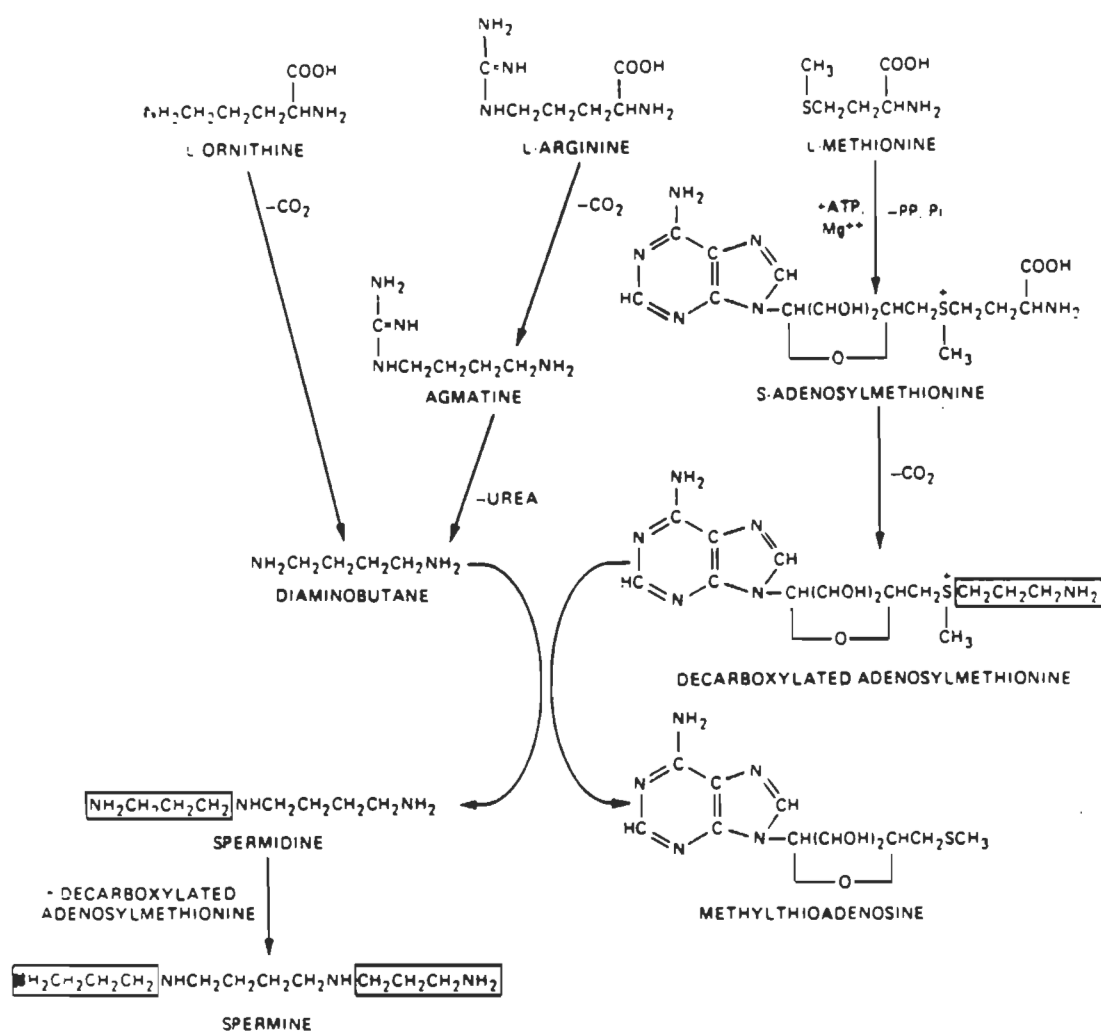


Figure 13: Biosynthèse des polyamines; putrescine, SPD et SPM <sup>69</sup>

Après quelques généralités, parlons plus précisément des PA dans l'appareil photosynthétique. Les polyamines spécifiquement identifiés chez les végétaux sont la spermine, la spermidine et la putrescine. La SPM est un tétraamine possédant quatre charges positives sur chacune de ses fonctions amines et un squelette carboné de dix carbones ( $C_{10}H_{30}N_4$ ). La SPD est un triamine chargé positivement sur chacun de ses trois amines et ayant un squelette carboné de sept carbones ( $C_7H_{22}N_3$ ). Quant à la putrescine, c'est un diamine de deux charges positives et un squelette carboné de quatre carbones ( $C_4H_{14}N_2$ )<sup>69</sup>. Il est à noter que pour les fins de ma maîtrise, j'ai limité ma recherche à deux polyamines : la spermine et la spermidine.

Des expériences démontrent que la concentration de PA dans les plantes dépend des conditions environnementales et de stress<sup>3</sup>. Cette variation du taux de PA suggère un rôle adaptatif et protecteur aux PA. La liaison des PA à des macromolécules indique par ailleurs un mécanisme de régulation des processus de base dans la plante. La division cellulaire, la morphogenèse, la sénescence et les réponses aux stress sont causés par les charges positives qui se lient aux acides nucléiques, aux phospholipides, à la membrane cellulaire et aux protéines<sup>3</sup>. Par exemple, l'enzyme transglutaminase est capable de lier les PA de façon covalente entre deux fonctions carboxyles de deux acides glutamiques dans une protéine. Il a aussi été démontré que la SPM peut se fixer au tryptophane<sup>3</sup>.

Les diamines et les polyamines exogènes retardent la dégradation des protéines, inhibent la perte de chlorophylle, stabilisent les membranes thylacoïdiennes et diminuent l'augmentation de l'activité normale de la ribonucléase qui accompagnent normalement la sénescence des feuilles détachées maintenues à l'obscurité <sup>3</sup>.

Kotzabasis et al. ont analysé le contenu en PA dans différentes structures photosynthétiques : thylacoïdes, PSII, CCLII, PSII purifié (contient la CP47, CP43, D1, D2 et cyt b559) ainsi que le centre réactionnel du PSII (D1, D2 et le cyt b559). Les analyses démontrent que la SPD se retrouve présente partout (feuilles entières, chloroplastes, thylacoïdes, PSII et CCLII). Cependant, elle est absente au niveau du PSII purifié et du centre réactionnel du PSII (PSII RC). Le contenu en SPD exprimé en nmol/mg Chl est de : 0.55 (thylacoïde), 0.38 (PSII), 0.21 (CCLII) <sup>3</sup>.

La SPM est le seul polyamine à se retrouver présent partout dans l'appareil photosynthétique, de la cellule entière au centre réactionnel du PSII. La concentration de SPM retrouvée en nmol/mg Chl est de : 0.32 (thylacoïde), 0.17 (PSII et CCLII), 27.8 (PSII purifié) et 72.46 (PSII RC). Cette présence



dans le PSII purifié et le PSII RC démontre une interaction rapprochée de ce PA avec la plus petite unité photochimiquement active du PSII<sup>3</sup>

Il y a un autre PA présent dans cette structure photosynthétique; c'est la putrescine (PUT). La PUT se retrouve particulièrement dans les thylacoïdes. Le taux de la PUT en nmol/mg Chl est de 2.88 (thylacoïde), 1.18 (PSII), 0.34(CCLII) et elle reste inexistante pour les particules de PSII purifiés et de PSII RC<sup>3</sup>.

Le rôle physiologique des PA dans les thylacoïdes et les sous-fractions n'est pas bien défini. La SPM peut agir comme un antioxydant dans plusieurs systèmes biologiques. L'association des PA avec la surface de la membrane résulte en une stabilisation, suggérant que les PA stabilisent la membrane en interagissant avec les lipides membranaires pour réduire la fluidité membranaire<sup>3</sup>. Cohen et al. démontrent que SPD et SPM sont les PA qui stabilisent la membrane thylacoïdienne des chloroplastes d'orges<sup>70</sup>.

Srivastava et al. ont démontré que ces PA préviennent la perte des Chl dans les feuilles sénescentes <sup>71</sup>. En utilisant des anticorps spécifiques contre le PSII et les autres protéines des thylacoïdes, Besford et al. ont proposé que les PA stabilisent les polypeptides des thylacoïdes des feuilles d'avoines durant des stress osmotiques <sup>72</sup>. En ce moment, la recherche ne peut certifier que les PA interagissent avec les nombreuses protéines du système photosynthétique ou avec les lipides des membranes <sup>3</sup>. Il apparaît que les PA pourraient avoir un rôle protecteur lors de différentes conditions de stress qui amènent la destruction de l'appareil photosynthétique.

Les PA sont chargés positivement [SPD(3+) et SPM(4+)]. Les mécanismes d'actions primaires sur la membrane seraient induits par la propriété électrostatique des PA comme porteurs de charges positives, faisant ainsi varier le potentiel de membrane qui est habituellement négatif. Même à de faibles concentrations, les PA peuvent considérablement modifier la charge négative à la surface de la membrane thylacoïdienne <sup>73</sup>.

## 4- MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 4.1 ISOLATION DE MEMBRANES ENRICHIES EN PSII

Les fragments membranaires enrichis en PSII ont été isolés des chloroplastes d'épinards selon Berthold et al.<sup>74</sup>. Les feuilles d'épinards (100 g), préalablement lavées, sont broyées dans un tampon d'homogénéisation constitué de: tricine-NaOH (pH 7.6) 50 mM, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, sorbitol 0.4 M, PMSF 1 mM et ascorbate 0.1 % dans un volume total de 300 ml. La solution est filtrée sur du coton fromage et le filtrat est recueilli dans des tubes à centrifuger. Ce dernier est centrifugé 7 minutes à 4000 rpm. Le culot est repris dans le tampon de resuspension: tricine-NaOH (pH 7.6) 50 mM, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM et ascorbate 0.1 % dans un volume total de 100 ml, et homogénéisé avant une nouvelle centrifugation de 7 minutes à 4000 rpm. Le nouveau culot est resuspendu dans un tampon de lavage : MES-NaOH (pH 6.2) 20 mM, NaCl 15 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM dans un volume total de 100 ml. La resuspension est homogénéisée et le dosage de la Chl effectué.

#### Dosage de la Chl:

10 µl d'extrait sont mélangés à 5 ml d'acétone 80 % . L'extrait est centrifugé 1 minute à 6000 rpm et l'absorbance est lue à 663 nm et 645 nm.

Calculs:

$$\text{Chl a: } 12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645} = \text{mg/l}$$

$$\text{Chl b: } 22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663} = \text{mg/l}$$

$$\text{Chl TOTALE: } 20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663} = \text{mg/l}$$

Détermination de la quantité de Triton à ajouter:

$$\text{Chl a} + \text{Chl b} = \text{Chl TOTALE}$$

$$\text{Chl totale} \times 500/1000 = y \text{ mg/ml}$$

$$y \times \text{nombre de ml de l'extrait} = y'$$

$$y' \rightarrow \text{mg de Chl au total dans l'extrait}$$

On veut 1 mg de Chl/ ml

[Triton ] stock = 20 % pour le traitement il faut Triton = 4 %.

L'extrait est incubé en présence de Triton X-100 pour 20 minutes dans la glace et à l'obscurité. L'extrait traité est dilué dans le même volume de tampon de lavage et centrifugé 10 minutes à 5500 rpm. Le surnageant est centrifugé 30 minutes à 17500 rpm et le culot résultant est resuspendu dans un volume minimal de tampon de lavage, homogénéisé et par la suite la concentration de Chl est déterminée. L'échantillon est dilué dans le dernier tampon pour obtenir [Chl] = 2.0 mg/ml

## 4.2 DÉGAGEMENT D'OXYGÈNE

Le zéro de l'enregistreur est ajusté avec le zéro du cadran sur le moniteur d'O<sub>2</sub> (Yellow Spring Instrument) et ensuite on ajuste le 100 % avec le dégagement d'O<sub>2</sub> à environ 20 % sur le moniteur d'O<sub>2</sub> (faire 100 % avec H<sub>2</sub>O en mettant le moniteur d'O<sub>2</sub> en position O<sub>2</sub>). Le bain circulateur est ajusté à 22° C

Dans la cellule, 3 ml de tampon (MES-NaOH (pH 6.2) 20 mM, NaCl 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM), 10 µg/ml de PSII et 360 µM de DCBQ, sont mis en présence sous agitation. Cette dernière est cessée et le barbotage avec l'azote est effectué pendant 30 secondes. Ensuite, l'électrode est insérée dans la cellule en prenant soin d'enlever les bulles d'air et l'agitation est remise. Le moniteur d'O<sub>2</sub> est positionné à O<sub>2</sub> et l'enregistreur est placé à Record avec une vitesse de déroulement du papier de 1 cm/min. Le projecteur est allumé, et la pente du tracé est obtenue. Cette dernière, permet de trouver l'activité du PSII en µmole O<sub>2</sub>/h mg Chl ce qui donne la [O<sub>2</sub>] dégagée par le PSII.

CALCULS:

- si le papier avance à une vitesse de 1 cm/min.
- si la température est de 22° C
- si le nombre de divisions/min est y
- si la concentration d'O<sub>2</sub> à 22° C dans l'H<sub>2</sub>O dans des conditions saturantes est de 0.262 μmole O<sub>2</sub>

$$y \text{ divisions/min} \times 10 \text{ } \mu\text{g Chl} \times 0.262 \text{ } \mu\text{mole O}_2/100 \text{ divisions} \times 1000 \text{ } \mu\text{g Chl/mg Chl} \times 60 \text{ min/h} = y \times 0.262 \times 60 \text{ } \mu\text{mole O}_2/\text{h mg Chl} = y \times 15.72 \text{ } \mu\text{mole O}_2/\text{h mg Chl}$$

4.3 PHOTORÉDUCTION DU DCIP

Le spectrophotomètre est placé à une longueur d'onde de 600 nm. L'absorbance est ajustée à l'aide du tampon de lavage: MES-NaOH (pH 6.2) 20 mM, NaCl 15 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM. 3 ml de solution A: 43.5 mg DCIP/50 ml de tampon de lavage est dilué 100 fois ([DCIP] = 30 μM). 7.5 μl de PSII (5 μg/ml) si ([Chl initiale]= 2.0 mg/ml) sont ajoutés au 3 ml de A. L'absorbance à 600 nm est lue et l'échantillon est éclairé une minute. Après cette illumination, l'absorbance est reprise (la réduction du DCIP entraîne une diminution de l'absorbance). La mesure des deux absorbances donne une ΔA<sub>600</sub>. Les mêmes étapes sont refaites en ajoutant en plus l'inhibiteur selon le cas.

CALCULS:

$\Delta A_{600}$  de 0.43/minute -----> 246  $\mu$ moles DCIP/h mg Chl  
 en faisant une règle de trois (on connaît le  $\Delta A_{600}$ ) il est possible de  
 trouver la [DCIP] qui est réduite. Toujours pour 7.5  $\mu$ l de PSII où 5  
 $\mu$ g/ml.

**4.4 ÉLECTROPHORÈSE (SDS-PAGE)**

Les électrophorèses, ainsi que leurs différents tampons sont ceux du système Laemmli <sup>75</sup>. En premier, il faut préparer le gel de résolution (15 %) constitué de: acrylamide 15 %, tris-HCl (pH 8.8) 0.375 M, SDS 0.1 %, persulfate d'ammonium 0.1 % (p/v), TEMED 0.07 % (v/v), et celui-ci se polymérise en 45 à 60 minutes. Après, le gel d'entassement (4 %) composé de: acrylamide 4 %, tris-HCl (pH 6.8) 0.125 M, SDS 0.1 %, persulfate d'ammonium 0.05 % (p/v), TEMED 0.05 % (v/v), est coulé sur le gel de résolution et ce dernier se polymérise en 45 à 60 minutes.

L'échantillon de PSII (à la lumière verte) est dilué pour avoir une [Chl] = 100  $\mu$ g/ml. Le PSII est mis en présence de l'inhibiteur dans un tube épendorff pour une incubation de 5 minutes à la température de la pièce. L'extrait est centrifugé 5 minutes à 40° C dans la microcentrifugeuse. Le culot est resuspendu dans 500  $\mu$ l de MES-NaOH (pH 6.2) 20 mM, puis recentrifugé et resuspendu dans 100  $\mu$ l de MES-

NaOH (pH 6.2) 20 mM. 50  $\mu$ l de PSII traité avec l'inhibiteur sont incubés en présence de 50  $\mu$ l de tampon d'échantillon : tris-HCl (pH 6.8) 0.125 M, SDS 4 %, glycérol 20 %, 2-mercaptoéthanol 10 % pour 30 minutes à la température de la pièce (lumière verte). Pendant ce temps, le dosage de la Chl est effectué selon le protocole d'extraction du PSII (voir section 2.1). A chaque puit (de 5 à 10 par gel) du gel d'entassement on dépose 7  $\mu$ g de PSII traité. La chambre et la base de l'appareil sont remplis avec le tampon d'électrodes: tris (pH 8.3) 0.025 M, glycine 0.192 M, SDS 0.1 %.

Les PSII incubés avec des [inhibiteur] variables sont déposés dans les puits et les protéines dans le gel vont migrer dans un courant constant de 17.5 mA et à un voltage variable. Le temps de migration est d'environ 2 heures. Le gel est coloré dans une solution de coloration: bleu de coomassie 0.125 %, méthanol 50 %, acide acétique 10 % pendant 3 heures sous agitation constante. La solution de coloration est enlevée et remplacée par la solution de décoloration I: méthanol 50 %, acide acétique 10 %, sous agitation pour 1 heure. La solution précédente est jetée et remplacée par la solution de décoloration II: méthanol 5 %, acide acétique 7 %, sous agitation pour une période de 12 heures.



#### 4.5 FLUORIMÈTRE PAM

La concentration de Chl utilisée pour les mesures est de 100  $\mu\text{g/ml}$  à la température de la pièce. Le tampon utilisé pour diluer l'échantillon de PSII est le tampon de lavage utilisé lors de l'extraction des PSII. Pour étudier l'effet des sels de calcium et de chlore ce tampon fut dépourvu de sels.

Le fluorimètre PAM (Pulse Amplitude Modulated) (Walz, Effeltrich, FRG) émet une lumière de mesure rouge à 680 nm de très faible intensité. Le faisceau d'excitation de fluorescence qui provient de cette lumière rouge est modulé à 1.6 KHz pendant 3 secondes puis à 100 KHz pendant 128 secondes. La fluorescence émise par l'échantillon est détectée par une diode de 710 nm. Un faisceau saturant (lumière blanche de 180  $\text{Wm}^{-2}$ ) non modulé est aussi utilisé sous forme de pulses périodiques.

#### **4.6 SPECTROSCOPIE D'ABSORBANCE**

Les mesures sont effectuées avec une concentration de Chl de 10  $\mu\text{g/ml}$  dans une cuvette à spectrophotomètre contenant le tampon de lavage utilisé lors de l'extraction de PSII. Les spectres d'absorption ont été mesurés pour des longueurs d'ondes de 350 à 750 nm. Le spectrophotomètre ( Diode Array, Hewlett Packard ) utilisé est relié à un ordinateur qui permet d'obtenir le tracé du spectre pour ces longueurs d'ondes et de les imprimer.

## **5- RÉSULTATS ET DISCUSSIONS**

Ce chapitre est divisé en quatre sous-chapitres selon des objectifs bien définis précédemment. Les sous-chapitres sont nommés en fonction des quatre approches expérimentales utilisées au cours de ma recherche.

### **5.1 EFFET DE LA SPERMINE ET SPERMIDINE SUR LE DÉGAGEMENT D'OXYGÈNE DU PSII.**

### **5.2 ANALYSE PAR ÉLECTROPHORÈSE DES PSII INHIBÉS PAR LA SPERMINE ET LA SPERMIDINE.**

### **5.3 ÉTUDE PAR FLUORESCENCE (PAM) DE L'EFFET INHIBITEUR DE LA SPERMINE ET DE SPERMIDINE SUR LE PSII.**

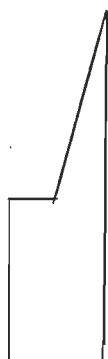
### **5.4 ÉTUDE DE LA VARIATION DES PROPRIÉTÉS D'ABSORPTION DES PIGMENTS**

## **5.1 EFFET DE LA SPERMINE ET DE LA SPERMIDINE SUR LE DÉGAGEMENT D'OXYGÈNE.**

La technique de dégagement d'oxygène (chapitre 4) est très fréquemment utilisée dans le domaine de la photosynthèse. Cette technique permet de mesurer l'activité des PSII ou des thylacoïdes par le dégagement d'oxygène. L'activité du transport d'électrons est proportionnelle à la concentration d'oxygène produite dans le milieu. Le dégagement d'oxygène permet de mesurer l'effet inhibiteur d'un agent exogène sur le PSII ou les thylacoïdes.

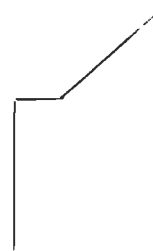
Il est important de bien situer certains paramètres du dégagement d'oxygène afin de mieux apprécier les résultats obtenus en dégagement d'oxygène. Les tracés du dégagement d'oxygène ressemblent à ceux-ci :

(1)



(1) PSII contrôle

(2)



(2) PSII inhibé

Dans ces deux tracés, on observe, au début un plateau signifiant que la concentration d'oxygène contenu dans la cellule après barbotage à l'azote (voir chapitre 4) est constante. Après l'obtention de ce plateau, le faisceau de lumière actinique est allumé. Ce faisceau éclaire la cellule à dégagement d'oxygène contenant des PSII à une concentration de Chl de 10µg/ml. Le PSII excité par la lumière oxyde  $2\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{O}_2$ . L'activité est un terme important. Elle se définit comme un nombre  $x$  de µmoles d'oxygène / heure mg de Chl qui sont dégagées par le PSII. Plus la pente du tracé est grande, prononcée et abrupte, plus l'activité est élevée car, la pente du tracé est proportionnel à l'activité de l'échantillon. La pente du tracé du PSII inhibé (2) est plus douce et moins prononcée que la pente du PSII contrôle (1). L'activité du PSII inhibé est considérablement réduite par rapport à l'activité du PSII contrôle.

Lorsqu'on travaille avec des inhibiteurs, une autre définition se rajoute : le pourcentage d'inhibition (% d'inhibition). Prenons l'exemple des tracés 1 et 2 : l'activité trouvée par la pente du tracé 1 égale 350 µmoles d' $\text{O}_2$ / h mg de Chl tandis que, le tracé 2 inhibé à une activité de 100 µmoles d' $\text{O}_2$ / h mg de Chl (ces résultats sont fictifs et servent à comprendre la notion d'inhibition). Le calcul du rapport du % d'activité égale l'activité du PSII inhibé (2) divisée par l'activité du PSII contrôle (1) x 100 ce qui implique que ce rapport vaut  $100/350 \times 100 = 28.6 \%$  d'activité. Ce résultat de 28.6 % implique que le PSII inhibé à 28.6 % d'activité par rapport au contrôle qui représente 100 % d'activité. Donc, si j'obtiens 28.6 %

d'activité, le reste est le % d'inhibition. Si l'activité maximale égale 100 % et que je soustrait le % d'activité du PSII inhibé (28.6 %) j'obtiens le % d'inhibition,  $100 \% - 28.6 \% = 71.4 \%$ . Par conséquent, mon PSII est inhibé de 71.4 % par rapport au contrôle.

#### **5.1.1 COURBE D'INHIBITION DU PSII PAR LA SPM ET LA SPD :**

Cette courbe (figure 14) est produite en faisant varier les concentrations de SPM de 0.01 mM à 0.5 mM dans une cellule à dégagement d'oxygène à 22°C (voir chapitre 4). Un temps d'incubation de 1 minute avant l'éclairement de l'échantillon est requis avec une concentration de Chl de 10 µg/ml pour le PSII. La courbe d'inhibition est produite afin de déterminer la concentration qui inhibe à 50 % ( $I_{50}$ ). Cette courbe de SPM a été produite avec les moyennes de plusieurs expériences concluantes.

### Courbe d'inhibition de la spermine

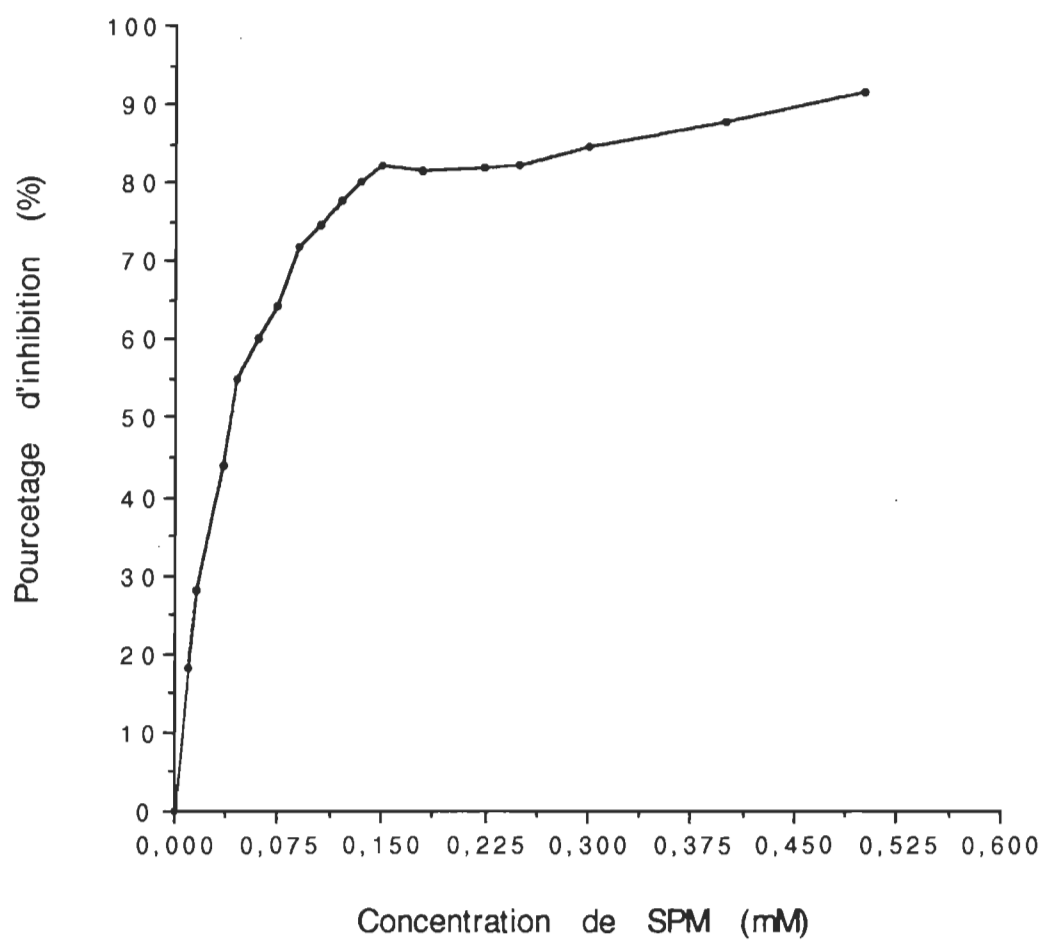


Figure 14 Courbe d'inhibition du PSII en présence de SPM

Ce graphique démontre que la  $I_{50}$  est de 40  $\mu\text{M}$  ou 0.04mM et que la  $I_{75}$  est de 100  $\mu\text{M}$  ou 0.1 mM. Dans cette figure, on observe qu'après la concentration de 0.15 mM qui correspond à 82 % d'inhibition, il se forme un plateau qui oscille entre 82 % et 90 % d'inhibition pour des concentrations correspondantes de 0.15 mM et 0.5 mM. L'allure du graphique est biphasique, montrant que plus de 70 % de l'activité du PSII est très sensible à des concentrations de SPM inférieures à 0.1 mM et que l'autre 30 % serait près de 10 fois plus résistante. La  $I_{100}$  devrait se retrouver vers 1 mM environ.

La figure 15 représente la courbe d'inhibition de la SPD qui a été effectuée en variant la concentration de SPD de 0.1 à 2 mM dans les mêmes conditions expérimentales que pour la courbe d'inhibition de SPM. Cette courbe représente les moyennes d'expériences concluantes.

La  $I_{50}$  ainsi que la  $I_{75}$  de la SPD sont respectivement de 900  $\mu\text{M}$  ou 0.9 mM et de 1400  $\mu\text{M}$  ou 1.4 mM. Ce graphique a une pente initiale plus douce et plus douce. Le pourcentage d'inhibition augmente progressivement en suivant l'augmentation d'inhibiteur ajouté. Il y a formation de plateau vers, approximativement, 1.4 mM jusqu'à 2 mM ce qui correspond respectivement à 75 et 86 % d'inhibition.



### Courbe d'inhibition de la spermidine

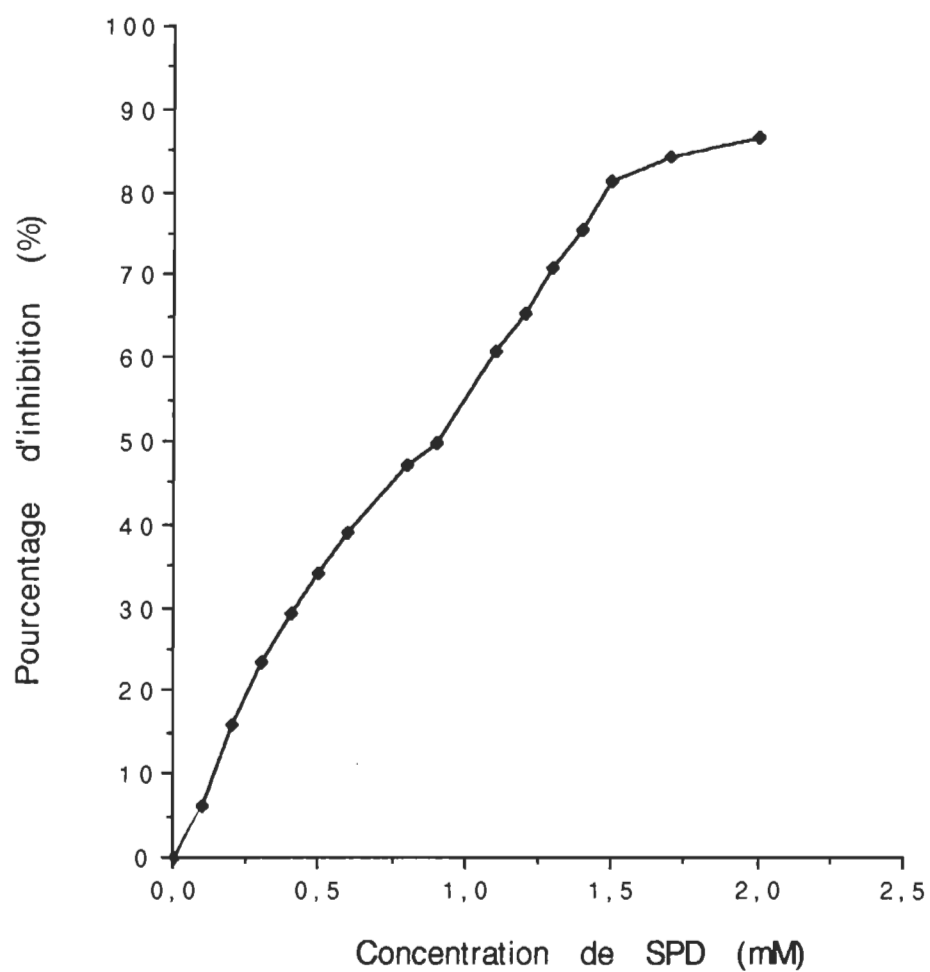


Figure 15 Courbe d'inhibition du PSII en présence de SPD

L'allure de la courbe d'inhibition de la SPM par rapport à celle de la SPD est plus prononcée et plus abrupte. En comparant la  $I_{50}$  de ces deux inhibiteurs, on observe que la  $I_{50}$  de SPM est plus faible que la  $I_{50}$  en présence de SPD soit 0.04 mM versus 0.9 mM. La SPM inhibe à 50 % à une concentration 22.5 fois plus petite que celle de la SPD. Le même calcul, par rapport à la  $I_{75}$ , démontre que la  $I_{75}$  de SPM (0.1 mM) est 14 fois plus petite que la  $I_{75}$  de la SPD (1.4 mM). Bref, la SPM a un plus grand pouvoir inhibiteur car, il inhibe à de plus faibles concentrations que la SPD.

La comparaison des  $I_{50}$  de SPM (0.04 mM) et de la SPD (0.9 mM) avec des inhibiteurs étudiés dans notre laboratoire démontre que les polyamines possèdent des  $I_{50}$  plus grandes que celles étudiées jusqu'à maintenant. Le  $Hg^{+2}$  (0.0025 mM pour le  $Hg(NO_3)_2$  et 0.01 mM pour  $HgCl_2$ ) s'attaque aux groupement SH des protéines <sup>76</sup>. Le tétranitrométhane (TNM) qui s'attaque aussi aux fonctions SH à une  $I_{50}$  de 0.0085 mM <sup>77</sup>. Le rouge de ruthénium, avec une  $I_{50}$  de 0.004 mM, agit près d'un site de  $Ca^{+2}$  et / ou  $Cl^-$  important pour le dégagement d'oxygène <sup>78</sup>.

Du point de vue biochimique (figure 13), la SPM possède quatre fonctions amines chargées positivement tandis que la SPD est un triamine avec trois charges positives. D'après les résultats obtenus, la  $I_{50}$  de SPM est égale à 0.04

mM tandis que la  $I_{50}$  de la SPM est égale à 0.9 mM. Donc, l'augmentation du nombre de charges positives sur un polyamine (4+ versus 3+) diminue la  $I_{50}$ . Probablement que l'action des polyamines (polycations) entraînent une modification ou une altération des forces électrostatiques au niveau du PSII. Les polyamines, avec leurs charges positives, modifient la charge électrique négative des membranes thylacoïdiennes <sup>73</sup>. Il est possible de concevoir que le même phénomène se produit au niveau du complexe du PSII qui possède plusieurs protéines chargées négativement.

#### **5.1.2 L'IMPORTANCE DU TEMPS D'INCUBATION SUR L'INHIBITION DU PSII PAR LES PA :**

Cette expérience a pour but de voir si l'action maximale des inhibiteurs peut produire un effet sur le pourcentage d'inhibition du PSII après différents temps d'incubations (1,2,5,10 et 15 minutes). Pour cette série de manipulations, la concentration de chaque inhibiteur est de 0.04 mM pour la SPM et 1 mM pour la SPD. La concentration de Chl utilisée est de 10 µg/ml dans la cellule à dégagement d'oxygène à 22° C. Le tampon utilisé est décrit dans la section matériels et méthodes.

Temps d'incubations (min.)	Activité Contrôle ( $\mu$ moles O <sub>2</sub> /h mg de Chl)	Activité PSII + SPM ( $\mu$ moles O <sub>2</sub> /h mg de Chl)	Pourcentage d'inhibition (%)
1	361.4	177.1	51
2	358.6	179.3	50
5	284.2	154.7	45.6
10	183.5	104.3	42.9
15	121.9	95.6	21.6

Tableau 1 Effets des temps d'incubations sur le pourcentage d'inhibition du PSII incubé en présence de SPM 0.04 mM.

Dans ce tableau 1, l'activité des contrôles (PSII sans SPM) et l'activité des PSII inhibés permettent de calculer le % d'inhibition. Le % d'inhibition optimum pour la SPM se rencontre à 1 minute avec 51 %. À 2 minutes, le % d'inhibition est très près du pourcentage d'inhibition optimal avec 50 %. À partir des temps d'incubations de plus de cinq minutes, une nette diminution du pourcentage d'inhibition est remarquée passant de 45.7 % (5min) à 42.9 % (10min) et finalement, 21.6 % (15min).

Donc le % d'inhibition maximal s'effectue rapidement et presque instantanément à 1 minute et demeure presque pareil à 2 minutes. La chute des % d'inhibition ainsi que des activités (contrôle et inhibé) pour 5, 10 et 15 minutes peut-être expliquée par le fait qu'après 5 min, les protéines pourraient être altérées par la chaleur. En effet, les protéines sont très sensibles à la chaleur et elles peuvent être dénaturées. Le CDO, responsable du dégagement d'oxygène, est très sensible à la chaleur car il est constitué de trois protéines extrinsèques qui sont facilement dénaturées dû à la localisation externes de celles-ci. La cellule à dégagement d'oxygène a une température de 22°C ce qui est loin d'être la température idéale pour la conservation des molécules biologiques qui est d'environ de 4°C. À des temps d'incubations minimales de 1 ou 2 minutes l'effet dénaturant de la température de la cellule à dégagement d'oxygène (22°C) ne se fait pas sentir. Une minute est le temps minimum requis pour effectuer une mesure de dégagement d'oxygène à cause du temps nécessaire pour le barbotage à l'azote et le temps requis pour stabiliser la concentration initiale d'oxygène dans la cellule avant l'éclairement par le faisceau lumineux.

Le tableau 2 représente les temps d'incubations de la SPD 1 mM par rapport au pourcentage d'inhibition. Cette expérience est effectuée dans les mêmes conditions expérimentales que la précédente. Le temps d'incubation requis pour obtenir le pourcentage d'inhibition maximal est de une minute avec

55.6%. À deux minutes, une légère baisse du % d'inhibition est observée (53.9 versus 55.6 %) . Cependant, cette différence est négligeable. À partir de cinq minutes, on observe une diminution des % d'inhibition de 47.6 à 32.0. Il est à remarquer également que les activités (contrôle et inhibé) diminuent graduellement avec des temps d'incubations élevés.

Temps d'incubations (min.)	Activité Contrôle ( $\mu$ moles O <sub>2</sub> /h mg de Chl)	Activité PSII + SPD ( $\mu$ moles O <sub>2</sub> /h mg de Chl)	Pourcentage d'inhibition (%)
1	352.3	156.4	55.6
2	341.8	157.6	53.9
5	257.6	135.0	47.6
10	195.9	106.9	45.4
15	139.2	104.4	25.0

Tableau 2 Effets des temps d'incubations sur le pourcentage d'inhibition du PSII incubé en présence de SPD 1 mM.

En comparant nos deux inhibiteurs, le même temps d'incubations (1 minute) est requis pour obtenir l'inhibition maximale. À 2 minutes nos deux polyamines ont une faible diminution négligeable de leurs % d'inhibitions par rapport à ceux observés à 1 minute. Les diminutions des % d'inhibition et des

activités chez nos deux inhibiteurs pour 5, 10 et 15 min est possiblement provoquée par l'altération et / ou modification des protéines du PSII.

Les protéines extrinsèques sont très sensibles aux stress environnementaux tels que la chaleur, la centrifugation et les sels. La raison de cette grande sensibilité est la localisation des protéines du CDO à l'extérieur de la membrane, face au lumen. Ainsi, elles sont à la merci des différents stress ou protéases. Nos deux polyamines inhibent très rapidement le PSII (moins d'une minute) à un % d'inhibition maximal. Par conséquent, l'interaction polyamines – PSII se fait presque instantanément.

### 5.1.3 EFFETS DES SELS SUR LE PSII INHIBÉ PAR LA SPERMINE ET LA SPERMIDINE :

Les cofacteurs inorganiques tel que le  $\text{Ca}^{+2}$  et le  $\text{Cl}^-$  sont essentiels pour l'obtention du dégagement d'oxygène maximal. Les atomes de  $\text{Cl}^-$  au nombre de quatre à cinq au niveau du CDO, peuvent se lier avec le Mn afin de favoriser le transport d'électrons parmi les atomes de Mn<sup>54</sup>. Le  $\text{Ca}^{+2}$ , au nombre de deux, est situé à des sites différents : un au niveau du CCLII et l'autre inclus au niveau des protéines intrinsèques D1 et D2 près de la protéine extrinsèque de 33 kDa. Ce dernier est primordial pour le dégagement d'oxygène car il interagit avec des Mn par l'intermédiaire d'un ligand carboxylé à l'état  $\text{S}_1$ <sup>81, 82</sup>.

Par le passé, il a été démontré que l'enlèvement des protéines extrinsèques de 16 et 24 kDa produit une diminution marqué du dégagement d'oxygène et que l'ajout de  $\text{Ca}^{+2}$  ou de  $\text{Cl}^-$  dans le milieu restaure partiellement l'activité du PSII<sup>83,84</sup>. J'ai tenté de reproduire ce phénomène connue avec mes inhibiteurs; la spermine et la spermidine.



Dans les expériences suivantes, la concentration de Chl utilisée est de 10  $\mu\text{g/ml}$  dans une cellule à 22°C avec un temps d'incubation de 1 minute. Les concentrations du sel monovalent est de 10 mM et celles des sels divalents, 5 mM. Les sels utilisés furent le NaCl,  $\text{CaCl}_2$  et le  $\text{MnCl}_2$ . Les concentrations de polyamines sont de 1 mM pour la SPD et de 0.04 mM pour la SPM. Le tampon du PSII est constitué de 20 mM de MES-NaOH seulement. Ce tampon est dépourvu de sel afin de ne pas avoir d'effet additif des sels. L'addition des sels n'avait aucun effet sur l'activité des PSII contrôle.

Sels	Pourcentage d'inhibition (%)
Aucun	51.6
NaCl	32.3
$\text{CaCl}_2$	0
$\text{MnCl}_2$	18.1

Tableau 3 Effets des sels sur le pourcentage d'inhibition des PSII traités avec 1mM de SPD.

Dans le tableau 3, le contrôle ou l'échantillon contenant aucun sel a un % d'inhibition de 51.6 %. Le NaCl, le  $\text{CaCl}_2$  et le  $\text{MnCl}_2$  renversent partiellement l'inhibition avec un % respectif de 32.3, 0 et 18.1. Le PSII incubé avec le NaCl a un % d'inhibition de 32.3. Si on compare le résultat pour le NaCl avec celui du

MnCl<sub>2</sub>, le % d'inhibition en présence de ce sel (18.1 %) est environ 2 fois plus petit (32.3 versus 18.1) que celui du NaCl. Le Cl<sup>-</sup> amène une diminution du % d'inhibition très significative (32.3 et 18.1 par rapport au contrôle avec 51.6 %). L'efficacité du CaCl<sub>2</sub> peut s'expliquer par l'action combinée des 2 cofacteurs Ca<sup>+2</sup> et Cl<sup>-</sup>. Par conséquent ces 2 cofacteurs essentiels à l'activité du PSII renversent totalement l'inhibition causé par la SPD en présence de CaCl<sub>2</sub>.

Donc l'inhibition de la SPD sur le PSII peut-être renversée par les deux ions inorganiques, le Ca<sup>+2</sup> et le Cl<sup>-</sup>. Ces résultats sont une moyenne de dix expériences concluantes.

Pour la SPM, les mêmes expériences ont été faites dans des conditions expérimentales identiques à la SPD. La concentration de SPM utilisée est de 0.04 mM.

Sels	Pourcentage d'inhibition (%)
Aucun	52.1
NaCl	49.8
CaCl <sub>2</sub>	26.2
MnCl <sub>2</sub>	50.8

Tableau 4 Effets des sels sur le pourcentage d'inhibition des PSII traités avec 0.04 mM de SPM.

Dans le tableau 4, le PSII inhibé contrôle sans sel à un pourcentage d'inhibition de 52.1 %. Les résultats des sels de NaCl, CaCl<sub>2</sub> et MnCl<sub>2</sub> sont respectivement de 49.8, 26.2 et 50.8 % d'inhibition. L'ajout de Cl<sup>-</sup> au PSII inhibé n'a pas d'effet significatif par rapport au contrôle. En effet le NaCl et le MnCl<sub>2</sub> ont respectivement 49.8 et 50.8 % d'inhibition. Ces résultats sont près de la valeur du contrôle.

Le seul sel qui renverse l'inhibition de la SPM est le CaCl<sub>2</sub> avec 26.2 % par rapport au contrôle avec 52.1 %. Pour ce dernier sel, il apparaît évident que l'ion qui renverse l'inhibition est le Ca<sup>+2</sup>. Alors que le Cl<sup>-</sup> n'a aucun effet sur l'inhibition

(voir les deux autres sels). L'effet inhibiteur de ce polyamine est partiellement renversé par le calcium (26.2 versus 52.1 %) et n'est aucunement affecté par le chlore.

L'action inhibitrice des deux polyamines peuvent être renversée par l'ajout de sels. Le  $\text{Ca}^{+2}$  renverse l'inhibition des deux polyamines tandis que le  $\text{Cl}^-$  peut contrer l'effet inhibiteur de la SPD mais pas celui de la SPM. Un  $\text{Ca}^{+2}$  est présent au niveau du complexe de dégagement d'oxygène et est primordial pour remplir cette fonction de dégagement d' $\text{O}_2$  <sup>82</sup>. Possiblement que les polyamines diminuent l'affinité du  $\text{Ca}^{+2}$  pour son site de liaison et que l'ajout exogène de cet ion restaure partiellement l'activité du PSII.

Avec les résultats ci-haut mentionnés, on se devait d'étudier chaque ion séparément à des concentrations différentes et croissantes sans dépasser 10 mM de ce sel. L'inhibition de la SPD peut-être renversé par les cofacteurs  $\text{Ca}^{+2}$  et  $\text{Cl}^-$ . Pour ces expériences le sel de calcium utilisé est le  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  et pour le sel de chlore, le NaCl. La concentration de SPD employée est de 1.4 mM afin d'obtenir environ 75 % d'inhibition pour le contrôle ( $I_{75}$ ). Les concentrations de sels sont 1, 3, 6 et 10 mM. Le tampon de dégagement d'oxygène (voir chapitre 4) est dépourvu de tous sels.

Concentration de NaCl (mM)	Pourcentage d'inhibition (%)
Aucun	76.3
1	58.6
3	43.1
6	38.2
10	19.7

Tableau 5 Effets des concentrations croissantes de NaCl sur le pourcentage d'inhibition du PSII traité avec SPD 1.4 mM.

Dans le tableau 5, le contrôle (PSII inhibé sans NaCl) a une valeur d'inhibition de 76.3 %. En augmentant les concentrations de NaCl et donc de chlore, une diminution importante du % d'inhibition de 76.3 à 19.7 est notée. Par conséquent le chlore renverse progressivement et partiellement l'inhibition produite par la SPD. Ces résultats moyens proviennent de cinq expériences concluantes.

Cette même expérience a été effectuée en employant le  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  pour vérifier l'impact du  $\text{Ca}^{+2}$  sur l'inhibition de la SPD. Les concentrations de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  employées sont de 1, 3, 6 et 10 mM

Concentration de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (mM)	Pourcentage d'inhibition (%)
Aucun	76.8
1	44.4
3	34.7
6	10.9
10	0

Tableau 6 Effets des concentrations croissantes de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  sur le pourcentage d'inhibition du PSII traité avec SPD 1.4 mM

En regardant le tableau 6, le contrôle (PSII inhibé sans sel) est inhibé à 76.8 %. À 1, 3, 6 et 10 mM de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  les % d'inhibition sont respectivement de 44.4, 34.7, 10.9 et 0. Le calcium renverse totalement l'inhibition de la SPD à 10 mM. L'action du calcium est très remarquée par la diminution rapide du % d'inhibition à des faibles concentrations.

Maintenant, passons à l'autre polyamine; la SPM. La concentration de SPM utilisée est de 0.1 mM (environ la  $I_{75}$ ) et les concentrations de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  sont de 1, 3, 6 et 10 mM. Ces expériences sont effectuées comme précédemment.

Concentrations de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (mM)	Pourcentage d'inhibition (%)
Aucun	74.5
1	38.2
3	18.4
6	7.8
10	0

Tableau 7 Effets des concentrations croissantes de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  sur le pourcentage d'inhibition du PSII traité avec SPM 0.1 mM.

Selon le tableau 7, le contrôle est inhibé à 74.5 % pour 0.1 mM de SPM. Pour les concentrations de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  de 1, 3, 6 et 10 mM des % d'inhibition respectifs de 38.2, 18.4, 7.8 ainsi que 0 sont obtenus. A 1 mM de calcium, il y a diminution de presque la moitié du % d'inhibition (74.5 versus 38.2). Par conséquent, des concentrations minimales de calcium produisent un renversement très significatif de l'inhibition. Donc le calcium renverse efficacement et totalement l'inhibition de la SPM.

En comparant les résultats de nos deux polyamines on observe que les hypothèses formulées à partir des tableau 3 et 4 sont justifiées. Le fait d'étudier chaque ion, calcium et chlore, séparément à des concentrations différentes (voir tableaux 5, 6 et 7) permettent d'appuyer hors de tout doute ces deux hypothèses. Il est a noter que le sel de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  a été préféré au  $\text{CaCl}_2$  car les ions  $\text{NO}_3$  n'ont pas d'effet sur le PSII et pour isoler l'action du calcium tandis que le  $\text{NaCl}$  est utilisé pour isoler l'impact du chlore sur le PSII car le  $\text{Na}^+$  n' a pas d'effet sur lui <sup>76</sup>.

#### **5.1.4 L'ÉTUDE DES POLYAMINES PAR PHOTORÉDUCTION DU DCIP.**

La photoréduction du DCIP est une autre technique qui permet de mesurer l'activité (matériels et méthodes) en  $\mu\text{moles}$  de DCIP réduites / heure .mg Chl. Le DCIP est un accepteur d'électrons du PSII et plus il est réduit, plus l'activité du PSII est élevé. Lorsque le DCIP est réduit, il change de couleur pour devenir incolore. Cette technique est utilisée dans le but d'étudier le site d'inhibition des polyamines par l'intermédiaire de donneurs d'électrons; le diphénylcarbazine (DPC) et l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ces deux donneurs agissent à des sites différents, les quatre Mn ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et la tyrosine Z (DPC) respectivement. En observant ces donneurs, il est possible de déterminer si les polyamines inhibent entre les Mn et la tyrosine Z <sup>85</sup>.



Malheureusement, cette méthode a dû être rejetée parce que le DCIP interagit directement avec les polyamines. Ainsi l'absorbance du DCIP avant l'éclairement augmente avec la concentration de polyamines. Pour la SPD (1 mM) l'absorbance est de 0.63 contrairement au contrôle de 0.45 . Donc, l'activité résultante est faussée par l'énorme augmentation de l'absorbance. Les mêmes «faux» résultats sont obtenus avec la spermine mais avec une moins grande augmentation au niveau des absorbances par rapport au contrôle. En présence de 0.04 mM de SPM une absorbance de 0.46 est obtenue par rapport au contrôle avec une absorbance de 0.43. Parce que la concentration de la SPM est bien plus faible que celle de la SPD (0.04 versus 1 mM) on peut donc s'attendre à un effet moindre sur l'absorbance du DCIP. Si on augmente la concentration de SPM l'effet sur l'absorbance devient plus significatif. Aucune hypothèse n'a été retenue pour expliquer l'interaction des PA avec le DCIP.

### **5.1.5 DISCUSSION**

Les deux polyamines, SPM et SPD, ont respectivement une  $I_{50}$  de 0.04 mM et 0.90 mM (figure 14 et 15). La spermine inhibe à de plus faibles concentrations que la spermidine. Au point de vue biochimique (voir figure 13) la SPM est chargées positivement quatre fois tandis que la SPD possède trois charges positives à pH physiologique. Probablement que la SPM à un plus grand pouvoir inhibiteur à cause qu'elle porte une charge positive de plus que la SPD. Par conséquent, il semble avoir un lien direct entre le nombre de charges positives et la capacité des polyamines à inhiber le PSII. Probablement, que ces polycations altèrent et/ou modifient les charges et / ou les forces électrostatiques entre les protéines responsables du dégagement d'oxygène (CDO). De plus, ces polycations peuvent causer des effets semblables pour d'autres protéines du PSII.

Les polyamines inhibent très rapidement le PSII ( < 1 min), tel que démontré par le tableau 1 et 2, pour obtenir l'inhibition maximale. Plus on augmente le temps d'incubation (5, 10 et 15 minutes) plus il y a diminution du % d'inhibition provoqué par une modification ou une altération du CDO. Ce dernier est très sensible aux différents facteurs de stress environnementaux car il est situé en périphérie du PSII. Un stress tel que l'incubation du PSII

dans une cellule à 22°C dénature les protéines extrinsèques du CDO sensible à la chaleur. Les résultats des Tableau 1 et 2, démontrent clairement que l'activité des contrôles diminue. Ceci serait une indication que le PSII dénaturé ne fixe pas les polyamines ou encore que l'action des polyamines est similaire à la dégradation thermique du PSII, les deux effets inhibiteurs n'étant pas totalement cumulatives. Cette interprétation est appuyée par la diminution des hélices  $\alpha$  et l'augmentation des feuillets  $\beta$  en présence de polyamines, un effet similaire à la dégradation thermique du PSII <sup>67</sup>. La perte d'activité des PSII pourrait être causée par la perte des cofacteurs inorganiques au niveau du CDO.

Les ions  $\text{Ca}^{+2}$  et  $\text{Cl}^-$  renversent l'inhibition causé par la SPD (voir tableau 3, 5. et 6) Pour la SPM seulement le  $\text{Ca}^{+2}$  renverse l'inhibition tandis que le  $\text{Cl}^-$  n'a aucun effet (voir tableau 4 et 7). L'inhibition des PSII par nos deux polyamines ont en commun la possibilité d'être renversés par le  $\text{Ca}^{+2}$ . Au niveau du CDO, un ion  $\text{Ca}^{+2}$ , près des Mn, assure le fonctionnement optimal de ce complexe <sup>81, 82</sup>. Il est probable que les polyamines modifient l'affinité du  $\text{Ca}^{+2}$  pour son site de liaison au niveau du CDO. Pour le  $\text{Cl}^-$  qui renverse l'inhibition de la SPD cela s'explique possiblement par la diminution de l'affinité du  $\text{Cl}^-$  pour son site sur le CDO du PSII. Le chlore agit comme ligand pour les Mn au site catalytique du CDO. <sup>86</sup>.

Le calcium et le chlore agissent comme ligands avec les Mn au niveau du site actif du C.D.O.<sup>82, 83, 86</sup>. Il est probable que les polyamines chargées positivement à plusieurs reprises (3 ou 4) diminuent l'affinité de ces ions inorganiques avec leurs sites de liaison près des quatre manganèses à cause des forces électrostatiques engendrées par la présence de ces polycations près des Mn. La perte de l'affinité pour les cofacteurs provoque la déstabilisation des quatre Mn et donc des états de transitions de  $S_0$  à  $S_4$ , diminuant ainsi fortement l'activité du PSII. L'ajout exogène de ces ions peut contrer l'effet électrostatique de ces polyamines et restaurer partiellement ou totalement le dégagement d'oxygène.

Dans le passé<sup>87, 88</sup>, il a été clairement démontré que l'enlèvement des protéines extrinsèques de 24 et 16 kDa provoque une diminution considérable du dégagement d'oxygène. L'ajout de  $Ca^{+2}$  et/ou de  $Cl^-$  restaure partiellement le dégagement d' $O_2$  dans les préparations de PSII dépourvues de ces deux protéines. L'inhibition des polyamines est renversée partiellement par le  $Ca^{+2}$  et le  $Cl^-$  (SPD seulement) ce qui implique qu'une partie du dégagement d' $O_2$  est restaurée. Cette restauration par les ions peut être causée par le fait que les polyamines ont comme mode d'action d'enlever des protéines extrinsèques du PSII.

Donc les polyamines interagissent possiblement au niveau des protéines extrinsèques du PSII près du site catalytique du CDO altérant ainsi les Mn situés à ce site important du dégagement d'oxygène.

## **5.2 ANALYSE PAR ELECTROPHORÈSE DES PSII INHIBES PAR LA SPM ET LA SPD:**

Les électrophorèses se font selon la méthode de Laemmli <sup>77</sup> (voir matériels et méthodes). La technique d'électrophorèse utilisée est celle du SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

Cette technique permet de séparer les protéines selon leurs poids moléculaires car le gel d'acrylamide possède de fins « pores » qui permettent le passage plus ou moins rapide des protéines. Cette migration des protéines dans le gel s'effectue à l'aide d'un générateur de courant à intensité constante de 17.5 mA et à voltage variable. Le gel pourvu de pores retient les protéines de haut poids moléculaires dans le haut du gel. Les protéines de faibles poids migrent rapidement dans le gel et se retrouvent donc dans le bas du gel.

Le tampon d'échantillon où le PSII est incubé pendant 30 minutes est très important pour dénaturer le complexe protéique du PSII en protéines isolées et linéaires. Le mercaptoéthanol coupe les liens disulfures et le SDS charge négativement les protéines et isole les protéines de par son action détergente puissante. Les protéines par l'action combiné du mercaptoéthanol

et du SDS, contenus dans ce tampon, sont retrouvées sous leurs formes isolées et linéaires.

Le générateur de courant assure aux protéines linéaires et chargées la migration à travers les pores d'acrylamide du gel. Cette migration protéique se produit par une variation du voltage et de la résistance à travers le gel selon l'équation:  $V=R \times I$  (voltage = résistance x intensité). Cette équation indique que le facteur clé de la migration électrophorétique est la résistance des protéines passant à travers les pores du gel si l'intensité est constante (17.5 mA) et que le voltage varie ( de 80 V à 150 V ). Au cours d'une même électrophorèse, le voltage augmente graduellement (80 V à 150 V ) ce qui implique que la résistance augmente aussi car le voltage est directement proportionnel à la résistance lorsque l'intensité demeure constante.

Le résultat final d'un gel d'électrophorèse d'un PSII contrôle est constitué de plusieurs bandes protéiques importantes. Pour évaluer les poids moléculaires de ces protéines, il faut absolument utiliser des standards de poids moléculaires connus ( 97, 66, 45, 31, 21 et 14 kDa ).

Pour effectuer ces électrophorèses, la concentration de Chl utilisée est de 100  $\mu\text{g} / \text{ml}$  et le temps d'incubation requis entre les polyamines et le PSII est de 5 minutes à 4°C. Un fait est à noter; la concentration de Chl au dégagement d'oxygène versus celle utilisée pour les électrophorèses sont de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  et 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Donc, un facteur de 10 est remarqué entre ces deux concentrations de Chl. Il faut augmenter la concentration de polyamines par un facteur de dix parce qu'en électrophorèse la concentration de Chl est dix fois plus grande qu'au dégagement d'oxygène. Par conséquent, dans le but de respecter le ratio inhibiteur/Chl, la  $I_{50}$  de SPM, qui est égale à 0.04 mM, devient 0.4 mM aux électrophorèses tandis que la  $I_{50}$  de SPD, qui est égale à 0.9 mM, devient 9 mM.

Pour chaque série de mesures effectuées en électrophorèse, il y a deux sous séries, celle des culots et l'autre des surnageants. Le gel de culots (membranes enrichies en PSII) donne les bandes protéiques du complexes PSII moins les bandes des protéines enlevés par le polyamine s'il y a lieu. Le gel de surnageant donne seulement la ou les bandes protéiques enlevées par le polyamine. Lors de la caractérisation d'un inhibiteur par électrophorèse, le plus simple est d'effectuer un gel de surnageant car il y a moins de protéines sur ce gel comparativement au gel de culot contenant toutes les protéines du PSII. Pour bien caractériser l'inhibiteur, les deux types de gels doivent être effectués.



### **5.2.1 EFFET DE LA SPERMIDINE SUR LE PSII**

La figure 16 et 17 représentent respectivement un gel d'électrophorèse de culot et de surnageant du PSII inhibé par la SPD. Chaque bande du gel est identifiée par un numéro (1 à 8) au haut de la photographie. Sur la figure 16 (gel de culot), la bande 1 correspond aux protéines standards de poids moléculaire (PM) connus de 14 à 97 kDa et qui servent de comparaison de PM avec les bandes 2, 3 et 4. La bande 2 représente le PSII contrôle, c'est à dire un PSII dépourvu de SPD qui permet de visualiser toutes les protéines du PSII. Ce contrôle sert de comparaison pour les bandes 3 et 4 afin de mieux déterminer les protéines enlevées ou seulement diminuées. La troisième bande représente le PSII traité en présence de 5 mM de SPD et la quatrième bande est le PSII traité avec la SPD 10mM. Pour ces dernières, on remarque une grande diminution des protéines de 16, 24 et 28 kDa comparativement au contrôle (bande 2). Les protéines de 16 et 24 kDa sont des protéines extrinsèques du PSII alors que celle d'environ 28 kDa correspondrait soit à la CP29 ou/et au CCLII<sup>89,77,62</sup>.

Le gel des surnageants (figure 17) aident à visualiser les différentes protéines enlevées par la SPD. La bande 1 correspond aux protéines standards tandis que la bande 2 est celle du PSII contrôle. La bande 3 révèle les trois mêmes protéines importantes que sur les bandes 3 et 4 de la figure 16

(culots) (28, 24 et 16 kDa ) et, en plus, elle en révèle une quatrième, due au polypeptide de 33 kDa. La diminution de la protéine de 33 kDa n'apparaît pas sur le gel de culot car, les protéines D1 et D2 ont des PM semblables ( 32 et 34 kDa ). Sur cette même bande 3, il y a une protéine d'environ 35 kDa qui correspond probablement à une protéine du PSI, la ferrédoxine NADP réductase ( 36 kDa ) ou à une sous-unité de l'ATPase. Lors de l'extraction des PSII, on obtient une membrane «enrichie» en PSII qui peut contenir certains autres complexes protéiques des thylacoïdes (PSI, cyt  $b_6f$  et l'ATPase). Cette présence minime de ces complexes thylacoïdiens amène des bandes protéiques supplémentaires dans les gels d'électrophorèses. La bande 4 est essentielle car, elle correspond au surnageant d'un PSII traité en présence d'urée qui enlève les trois protéines extrinsèques du PSII (33, 24 et la 16 kDa ). Dans la bande 4, on observe les trois même protéines extrinsèques que celles retrouvées dans la bande 3 sauf, qu'en plus, une protéine supplémentaire de PM d'environ 28 kDa est retrouvée dans la bande 3.

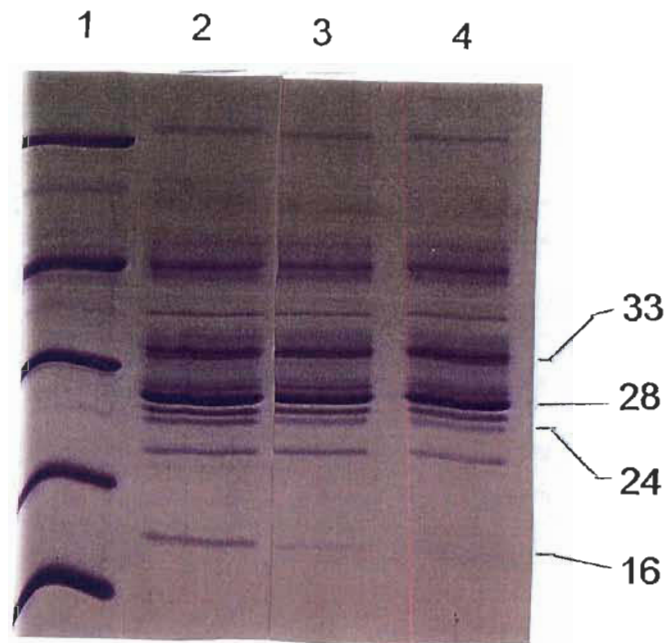


Figure 16 Gel d'électrophorèse du PSII traité avec la spermidine

PM standards sont : 14, 21, 31, 45, 66 et 97 kDa .

Gel de culots:

bande 1: standards de PM

bande 2: PSII contrôle

bande 3: PSII + 5 mM de SPD

bande 4 : PSII + 10 mM de SPD

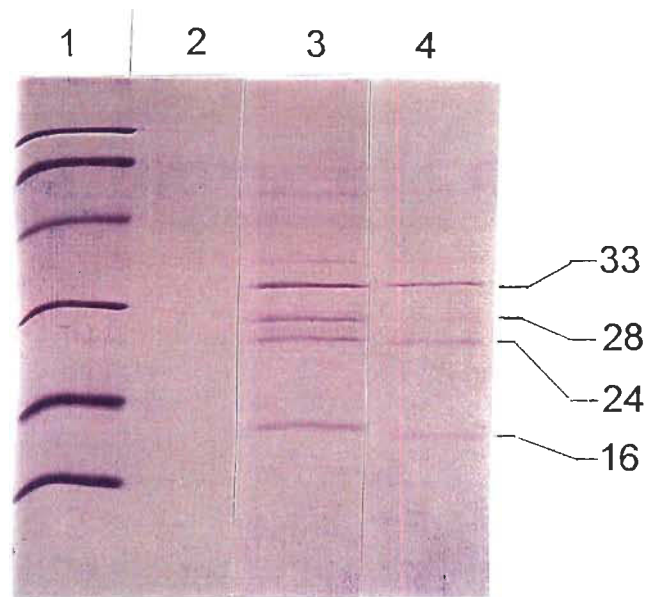


Figure 17 Gel d'électrophorèse du PSII traité avec la spermidine

PM standards sont : 14, 21, 31, 45, 66 et 97 kDa.

Gel de surnageants

bande 1: standards de PM

bande 2: PSII contrôle

bande 3: PSII + 10 mM de SPD

bande 4: PSII traité à l'urée

Le calcium et le chlore renversent l'effet inhibiteur de la SPD sur le dégagement d'oxygène (5.1.3). Par conséquent, une question est soulevée. Est-ce que ces deux cofacteurs inorganiques ont un effet au niveau de l'enlèvement des protéines? La figure 18 illustre cette expérience. Pour étudier l'effet des deux ions, il est plus facile de détecter un changement au niveau de l'enlèvement des protéines avec l'aide de gels de surnageants. La bande 1 est le standard de PM tandis que la bande 2 représente le surnageant de PSII traité en présence de 100 mM de NaCl. Les bandes 3 et 4 représentent des PSII traitées avec 10 mM de SPD et avec, respectivement, des concentrations de 100 mM de NaCl et 100 mM de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Il ne faut pas oublier que les concentrations de sels ont été ajustées selon les différences de concentration de Chl entre le dégagement d'oxygène et l'électrophorèse pour respecter le ratio Chl/sel. La bande 5 illustre le PSII traité avec 100 mM de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . La sixième bande est celle du surnageant de l'urée qui enlève les trois protéines extrinsèques du PSII.

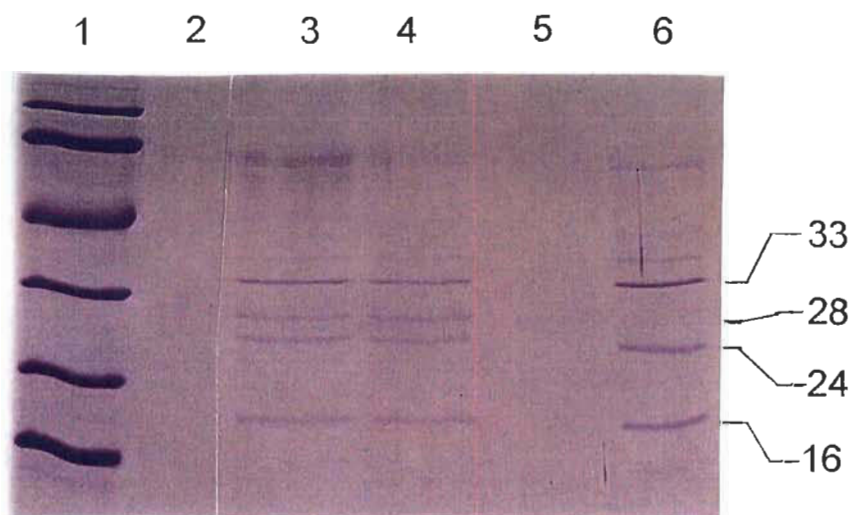


Figure 18: Effet du calcium et du chlore sur le PSII traité avec la SPD.

PM des standards: 14, 21, 31, 45, 66 et 97 kDa

Gel de surnageants

bande 1: standards de PM

bande 2: PSII contrôle + 100 mM de NaCl

bande 3: PSII + 10 mM de SPD + 100 mM de NaCl

bande 4: PSII + 10 mM de SPD + 100 mM de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

bande 5: PSII contrôle + 100 mM de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

bande 6: PSII traité avec l'urée.

Les bandes 3 et 4 du gel de la figure 18 illustrent les mêmes protéines enlevées que celles de la bande 3 sur le gel de la figure 17. Cela implique que le calcium et la chlore n'ont aucun effet sur les protéines enlevées par la SPD (33,28, 24 et 16 kDa ). Ces ions n'empêchent pas l'enlèvement de ces quatre protéines par la SPD.

### **5.2.2 EFFET DE LA SPERMINE SUR LE PSII**

La figure 19 et 20 représentent respectivement le gel d'électrophorèse des culots et des surnageants de la spermine. A la figure 19, la bande 1 contient les standards de PM connus et la bande 2 provient du PSII contrôle. Les bandes 3 et 4 proviennent des PSII inhibés par 0.25 mM et 0.50 mM de SPM respectivement. En comparant ces deux dernières bandes avec la bande contrôle, on s'aperçoit qu'il y a enlèvement des protéines extrinsèques de 24 et de 16 kDa.

Quant au surnageants (figure 20), en comparant la bande 3 avec les bandes 1 et 5, on s'aperçoit que deux protéines (24 et 16 kDa) sont arrachées au PSII traité par la SPM. Il faut se rappeler qu'au dégagement d'oxygène, l'inhibition de la spermine est renversée par le calcium seulement mais, pas par

le chlore. Comme la bande 3, la bande 4 illustre les deux mêmes protéines. Donc, le calcium qui est ajouté à la spermine de la bande 4 n'a aucun effet sur l'enlèvement des protéines de 24 et 16 kDa.

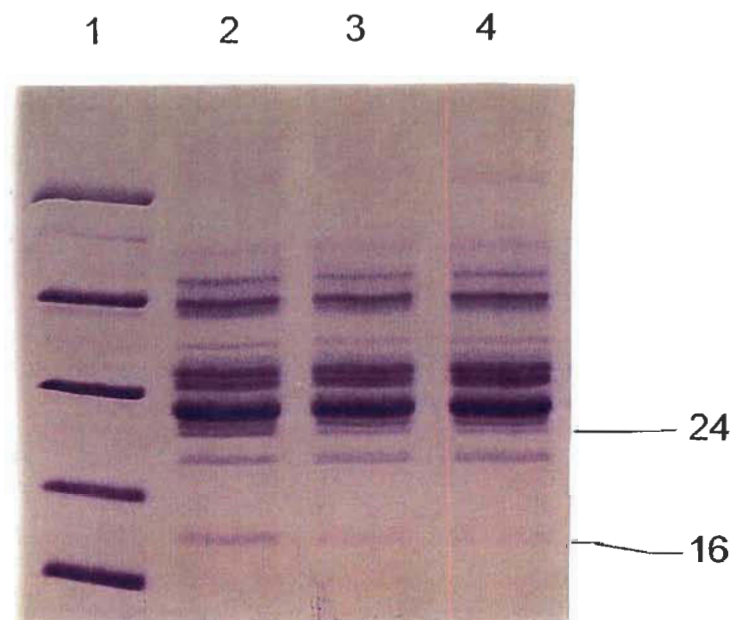


Figure 19: Gel d'électrophorèse du PSII traité par la spermine

PM standards: 14, 21, 31, 45, 66 et 97 kDa

Gel de culots

bande 1 : standards de PM

bande 2 : PSII contrôle

bande 3 : PSII + 0.25 mM de SPM

bande 4 : PSII + 0.50 mM de SPM



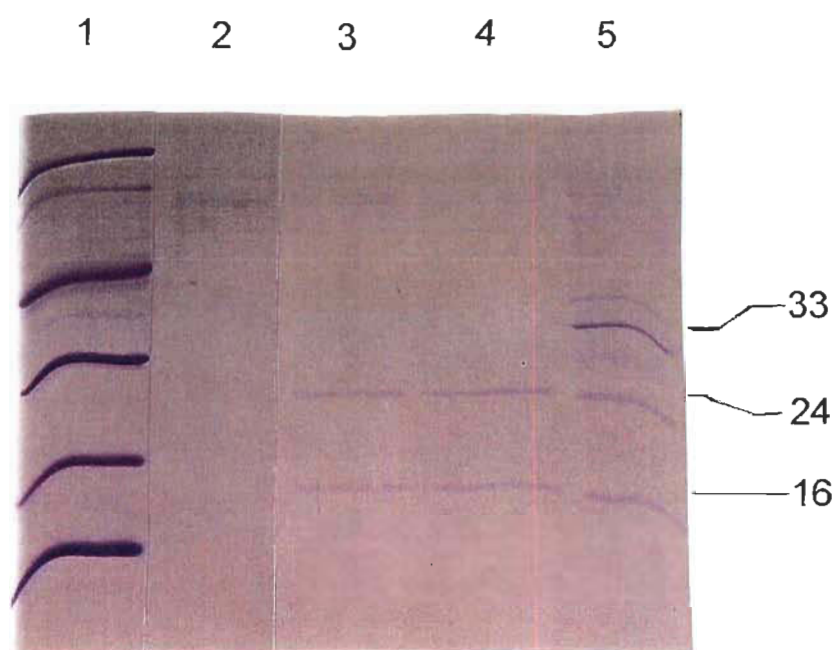


Figure 20 : Effet du calcium sur le PSII traité avec la SPM

PM standards: 14, 21, 31, 45, 66 et 97 kDa

Gel de surnageants

bande 1 : standard

bande 2 : PSII contrôle

bande 3 : PSII + 0.50 mM de SPM

bande 4 : PSII + 0.50 mM de SPM + 100 mM de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

bande 5 : PSII traité avec l'urée

### 5.2.3 DISCUSSION:

Les deux polyamines étudiés provoquent l'enlèvement de protéines extrinsèques essentielles au fonctionnement optimal du CDO. La SPD enlève les trois protéines extrinsèques de 33, 24 et 16 kDa tandis que la SPM enlève seulement deux de ces protéines du CDO, la 24 et la 16 kDa. La SPD enlève aussi une autre protéine non extrinsèque d'environ 28 kDa correspondant au CCLII et /ou à la CP29.

L'inhibition du dégagement d'oxygène par la SPD est renversée par le calcium et le chlore, alors que l'ajout de ces ions inorganiques n'empêchent pas l'enlèvement des trois protéines impliquées dans l'oxydation de l'eau. L'inhibition par la SPM est renversé par le  $\text{Ca}^{+2}$  (dégagement d' $\text{O}_2$ ) malgré que le calcium n'a aucun effet sur l'enlèvement des protéines en électrophorèse.

Comment expliquer cette différence entre le dégagement d'oxygène et les électrophorèses pour ces cofacteurs. On sait que l'enlèvement des protéines extrinsèques diminue l'activité du PSII et qu'en ajoutant ces cofacteurs l'activité est restaurée. Ces ions sont essentiels pour obtenir le rendement maximal du CDO et par conséquent, les ions calcium et chlore

n'empêchent pas l'enlèvement des protéines extrinsèques mais agissent près des Mn afin de reconstituer un CDO compétent et de permettre aux états d'oxydations de  $S_0$  à  $S_4$  de se faire sans entraves. Les ions  $Ca^{+2}$  et  $Cl^-$  possèdent des sites de liaison près des Mn et ces sites sont vraisemblablement altéré par l'ajout de polyamines. Les sites modifiés pourraient perdre leur cofacteurs inorganiques. L'ajout de manière exogène des ions calcium (pour la SPM et la SPD) et chlore (pour la SPD) permettraient à ces ions de se relier aux niveau de leurs sites de liaison au niveau du CDO.

### **5.3 ÉTUDE PAR FLUORESCENCE DE L'EFFET INHIBITEUR DE LA SPM ET DE LA SPD SUR LE PSII.**

Les techniques de dégagement d'oxygène et d'électrophorèse sont des techniques invasives car elles nécessitent l'ajout d'un accepteur d'électrons (DCBQ) ou elles modifient les protéines par l'action de détergents. La technique de fluorescence est non-invasive et renseigne de l'efficacité du transport d'électrons dans les PSII intacts ou altérés par des agents chimiques ou physiques<sup>90</sup>.

#### **5.3.1 INTRODUCTION À LA FLUORESCENCE**

Dans l'appareil photosynthétique, l'énergie lumineuse est captée par des pigments contenus dans les antennes localisées dans les deux photosystèmes, le PSI et le PSII. Lorsque l'énergie lumineuse excite la Chl, elle passe de l'état fondamentale à l'état singulet et transfère ensuite son énergie à une Chl voisine pour finalement revenir à son état initial. Pour dissiper son énergie, la Chl utilise plusieurs modes. Le premier est la dissipation par excitation du centre réactionnel ce qui amène la séparation de charge et provoque un transport d'électrons actif. La seconde est la perte de son énergie par désactivation thermique. La dernière est l'émission de fluorescence<sup>91</sup>.

À la température de la pièce, la fluorescence provient majoritairement du PSII (environ 95%). Le PSII est capable d'émettre de la fluorescence variable (Fv). Comparativement, le PSI ne peut émettre cette fluorescence. La Fv observée chez le PSII fait en sorte que celui-ci est le plus étudié par la méthode fluorométrique, au détriment du PSI.

#### **5.3.1.1 DEFINITION DE LA FLUORESCENCE CONSTANTE (F<sub>0</sub>)**

F<sub>0</sub> désigne la fluorescence minimale, initiale et constante. Elle représente l'émission de fluorescence par les Chl a excitées avant que cette énergie ait été transférée au centre réactionnel du PSII. Par conséquent, Q<sub>A</sub> est totalement oxydé au niveau de F<sub>0</sub>. L'intensité du faisceau lumineux utilisé pour mesurer F<sub>0</sub> doit être trop faible pour activer le transport d'électrons.

#### **5.3.1.2 DEFINITION DE LA FLUORESCENCE VARIABLE (Fv)**

La fluorescence variable (Fv) est le résultat de la réduction partielle de Q<sub>A</sub> et donc du pool de plastoquinones. Cette fluorescence est la différence entre l'intensité de la fluorescence à un temps (F<sub>t</sub>) ou à un niveau donné (ex. F<sub>m</sub>) et l'intensité de la fluorescence au niveau 0 (F<sub>0</sub>). Ce qui implique que le

transport d'électrons s'effectue normalement. L'intensité lumineuse ambiante doit être suffisante pour stimuler le transport d'électrons <sup>91</sup>.

### **5.3.1.3 DEFINITION DE LA FLUORESCENCE MAXIMALE (Fm)**

La fluorescence maximale (Fm) est obtenue en lumière saturante qui réduise totalement les Q<sub>A</sub>. Par conséquent les Chl excitées sont désactivées par l'émission de fluorescence et les Q<sub>A</sub> réduites amènent une recombinaison de charge au niveau du centre réactionnel (P680). Cette énergie sera retransmise à l'antenne de Chl du PSII puis cette dernière émet de l'énergie sous forme de fluorescence afin d'amener les Chl excitées à leur état fondamental.

### **5.3.1.4 FORMULES UTILISÉES POUR ANALYSER LES RÉSULTATS DE FLUORESCENCE**

Le rendement quantique maximal de la photochimie du PSII correspond à l'efficacité photochimique maximale du PSII. Ce paramètre est utilisé pour évaluer l'impact des stress environnementaux, chimiques ou physiques sur le

PSII et plus les stress affectent le PSII plus le rapport diminue. Le rendement quantique ( $\phi_0$ ) est égal à:

$$\phi_0 = F_{vmax} / F_m$$

ou  $F_{vmax} = \text{fluorescence variable maximale} = F_m - F_o$

Le rapport  $F_o/F_m$  indique l'état du transport d'électron et aussi si l'antenne est altérée ou non par les différents stress.

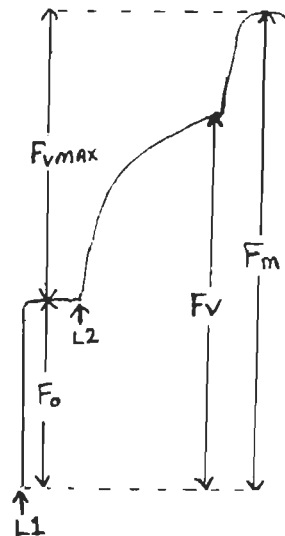


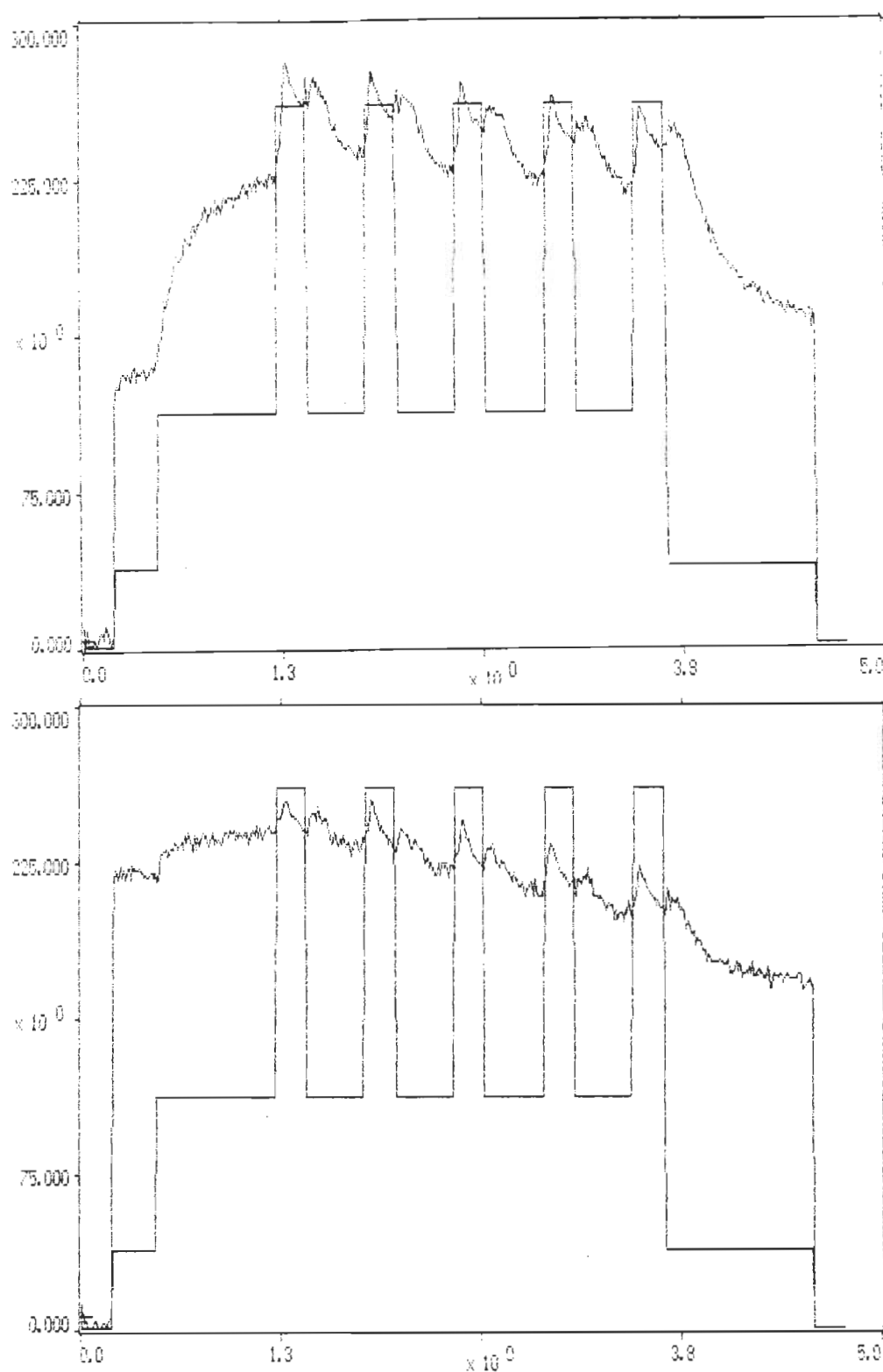
Figure 21: schéma d'un tracé fluorimétrique avec les différents paramètres utilisés en fluorescence.  $F_o$  = fluorescence constante,  $F_v$  = fluorescence variable,  $F_{vmax}$  = fluorescence variable maximale ( $F_m - F_o$ ) et  $F_m$  = fluorescence maximale. Les faisceaux lumineux sont les suivants :  $L1 = 1.6$  kHz pendant 3 sec puis 100 kHz pendant 128 sec;  $L2 =$  illumination actinique ( $3.8 \text{ W/m}^2$ , 680 nm)

### **5.3.2 ETUDE DE LA SPD PAR FLUORESCENCE**

Un léger rappel s'impose sur les résultats obtenus par la SPD. Par la technique d'électrophorèse les résultats démontrent que les trois protéines extrinsèques et une protéine correspondant au CCLII ou/et CP29 sont enlevées. La SPD agit donc du côté donneur d'électrons, c'est à dire le côté qui donne ses électrons au centre réactionnel (P680). Le côté donneur est constitué des trois protéines extrinsèques, de la tyrosine Z et des quatre manganèses formant ainsi le complexe de dégagement d'O<sub>2</sub>

La figure 22, présente le tracé fluorimétrique du PSII contrôle (en haut) et du PSII inhibé par 3 mM de SPD (en bas). En regardant ces deux tracés on remarque que le PSII inhibé par 3 mM de SPD montre une augmentation de la fluorescence constante (Fo) et une diminution de la fluorescence variable maximale et de la fluorescence maximale (Fvmax et Fm) par rapport au contrôle. Il est à noter que ces deux tracés ont la même échelle de mesure (voir à gauche, 0 - 300).



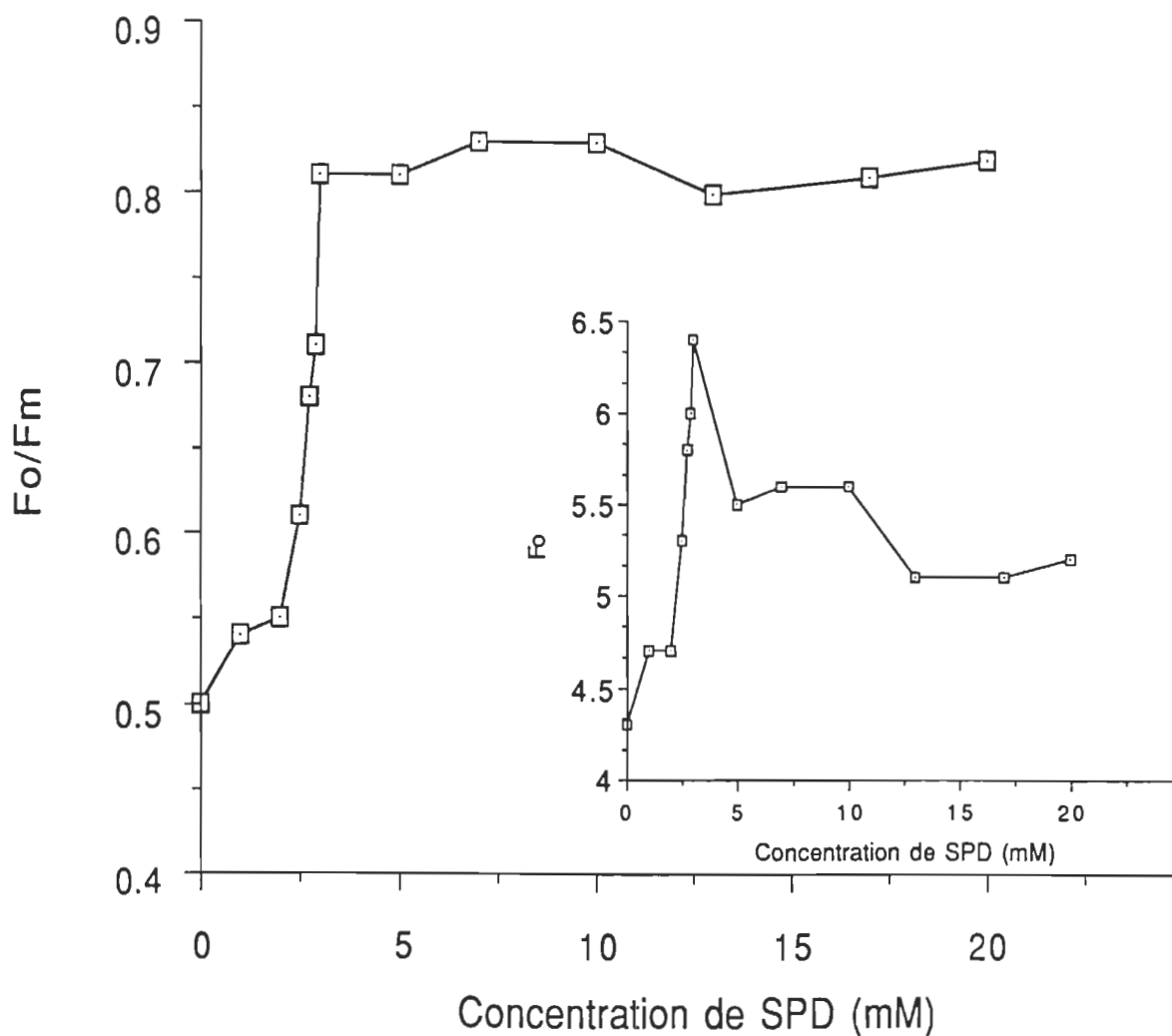


**Figure 22 :** Courbe de fluorescence chlorophyllienne du PSII contrôle (en haut) et du PSII inhibé par 3 mM de SPD (en bas). L'échelle de mesure de la fluorescence, à gauche de l'axe des y, est comprise entre 0 et 300 unités arbitraires.

Maintenant analysons le tracé du PSII inhibé par la SPD par rapport à celui du contrôle (figure 22). La  $F_o$  correspond à la fluorescence constante et n'est pas associée à la photochimie du PSII mais plutôt à l'énergie perdue par les antennes lors du transfert d'excitons vers le centre réactionnel du PSII (le P680). Habituellement, la  $F_o$  est constante entre le contrôle et le PSII inhibé. Elle n'est pas affectée par l'état (actif ou inactif) du transport d'électrons. Sur ce tracé  $F_o$  augmente passant d'environ 130 à 225 unités pour le PSII contrôle et le PSII inhibé respectivement.

La figure 23 représente le paramètre  $F_o/F_m$  par rapport aux concentrations de SPD. Le rapport  $F_o/F_m$  est respectivement de 0.50 et 0.81 pour le contrôle et le PSII inhibé par 3 mM SPD. Les résultats possèdent un écart type de plus ou moins 0.02. Ce paramètre augmente graduellement avec la concentration de SPD pour finir à 0.80 pour 20 mM de SPD. Dans cette même figure en insertion le graphique de  $F_o$  par rapport aux concentrations de SPD démontre que la  $F_o$  augmente rapidement jusqu'à 3 mM (6.4) puis diminue (5.2). Ce paramètre démontre clairement que  $F_o$  du PSII inhibé est augmentée par rapport au contrôle (4.3). Cette augmentation de la  $F_o$  par rapport au contrôle (surtout observée avant 3 mM de SPD) implique l'altération des complexes collecteurs de lumières. Par conséquent l'énergie perdue par les antennes lors du transfert des excitons vers le centre réactionnel est augmentée. La SPD modifie donc l'antenne du PSII. Cette altération des

complexes antennaires à été démontrée en électrophorèse par l'enlèvement d'une protéine d'environ 28 kDa correspondant au CCLII ou / et la CP29.

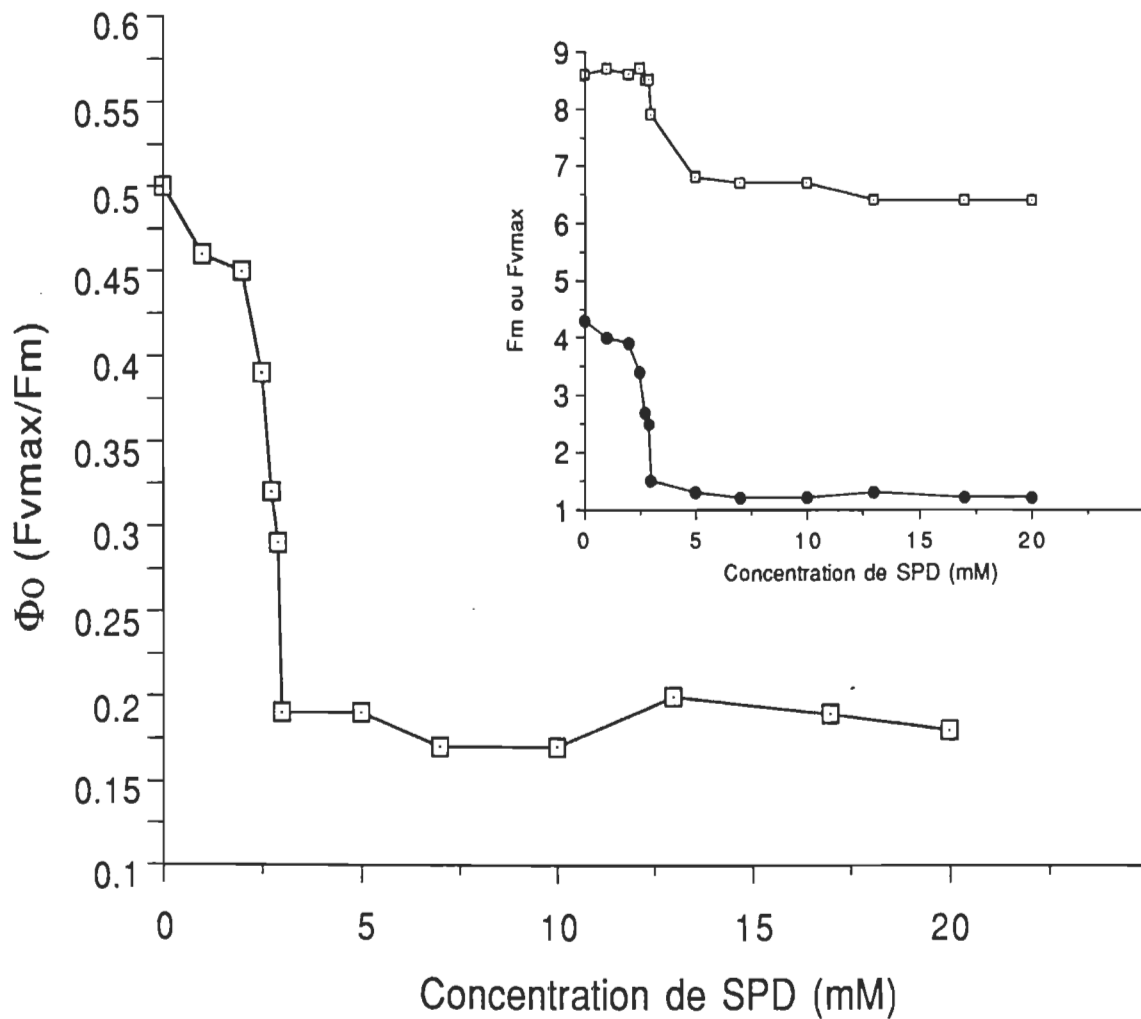


**Figure 23:** Graphique de  $F_o/F_m$  en fonction des concentrations de SPD. Insertion: Graphique de  $F_p$  en fonction des concentrations de SPD. Le contrôle et le PSII inhibé par 3 mM ont des  $F_o/F_m$  de 0.5 et 0.81 respectivement.

Le deuxième paramètre à observer, c'est  $F_{vmax}$  qui correspond à la valeur de la fluorescence maximale ( $F_m$ ) à laquelle on soustrait la valeur de la fluorescence constante ( $F_o$ ). Cette fluorescence est d'origine photochimique (dépend du transport d'électrons). Dans le tracé (figure 22) du PSII traité avec 3 mM de SPD, la  $F_{vmax}$  est grandement atténuée par rapport au contrôle. Cette atténuation de  $F_{vmax}$  peut être causée par des dommages au côté donneur d'électrons. Dans ce cas, l'arrivée des électrons au centre réactionnel est limité car, le CDO est altéré. Cela diminue la photoréduction de  $Q_A$  et proportionnellement, l'émission de fluorescence.

Un paramètre important lors de la variation de  $F_{vmax}$  c'est le rendement quantique ( $\phi_0 = F_{vmax}/F_m$ ) représenté en fonction des concentrations de SPD dans la figure 24. Les  $\phi_0$  pour le contrôle et le PSII traité avec 3 mM de SPD sont de 0.50 et 0.19. Les résultats de ce graphique possèdent un écart type de plus ou moins 0.02. Le contrôle présente un  $\phi_0$  de 0.50 et plus on augmente les concentrations de SPD plus le  $\phi_0$  diminue pour terminer avec un  $\phi_0$  de 0.20 à une concentration de SPD de 20 mM. Cette diminution du rapport de  $\phi_0$  indique qu'il y a effectivement un stress qui affecte l'efficacité du PSII. Ce rapport diminue car,  $F_{vmax}$  diminue (voir graphique en insertion) et donc, cette atténuation de la fluorescence variable provient de l'altération du côté donneur d'électrons. Dans cette figure en insertion on observe aussi le tracé de  $F_m$  en fonction des [SPD] ou l'on remarque que  $F_m$  diminue avec l'augmentation de la

[SPD]. Par conséquent le  $\phi_0$  est directement influencé par la diminution de  $F_m$  et  $F_{vmax}$ .



**Figure 24 :** Graphique de  $\Phi_0$  en fonction des concentrations de SPD. Insertion: Graphique de  $F_m$  (□) et de  $F_{vmax}$  (●) en fonction des concentrations de SPD. Le PSII contrôle a un  $\Phi_0$  de 0.5 et le PSII inhibé par 3 mM de SPD présente un  $F_s$  de 0.19.

### **5.3.2.1 EFFET DES IONS CALCIUM ET CHLORE SUR LE PSII INHIBÉ PAR LA SPD PAR FLUORESCENCE :**

Tel que démontré auparavant dans la section 5.1.3, l'inhibition du dégagement d'oxygène par la SPD est renversée par le  $\text{Ca}^{+2}$  et le  $\text{Cl}^-$ . Mais ces ions n'ont aucun effet sur l'enlèvement de protéines. Regardons si l'ajout de ses ions peut modifier les paramètres  $\phi_0$  et  $F_0/F_m$ . Pour ces expériences les sels utilisés sont le  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  et le  $\text{NaCl}$ . Commençons par le sel de calcium avec la SPD (voir tableau 8).

Dans le tableau 8 on remarque que le PSII sans SPD avec 100 mM de calcium est déjà affecté par rapport au contrôle. Cet effet du calcium exogène se fait jusqu'à la concentration de 1 mM ou l'effet observé est léger à cette concentration. Selon le paramètre  $F_0/F_m$  on observe une augmentation de  $F_0$  pour les PSII traités avec le calcium en absence de SPD par rapport au contrôle. Probablement qu'à des concentrations élevées de calcium celui-ci modifie l'antenne du PSII. Cependant même si le calcium a un effet inhibiteur sur le PSII dépourvu de SPD, il n'en demeure pas moins que celui-ci ne renverse pas l'effet de la SPD sur les paramètres de fluorescence. Les paramètres  $\phi_0$  et de  $F_0/F_m$  ne varient pas de façon significative entre les PSII inhibés sans calcium et les PSII inhibés avec présence de calcium.

[SPD] (mM)	[Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] (mM)	$\phi_0$	Fo/Fm
PSII contrôle	-----	0.48	0.52
-----	100	0.12	0.88
3	-----	0.24	0.76
3	100	0.25	0.75
-----	10	0.38	0.62
3	-----	0.12	0.88
3	10	0.12	0.88
-----	5	0.39	0.61
3	-----	0.12	0.88
3	5	0.11	0.89
-----	1	0.45	0.55
3	-----	0.14	0.86
3	1	0.13	0.87

Tableau 8 Effets du Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> sur  $\phi_0$  et sur Fo/Fm du PSII traité avec 3mM de SPD.

Le tableau 9 présente l'effet du chlore sur la SPD, le sel de chlore utilisé est le NaCl. En comparant les valeurs de  $\phi_0$  et Fo / Fm entre les PSII inhibés en absence de sel et les PSII inhibés en présence de chlore on observe que ces paramètres ne varient pas de manière significative car l'écart type est de

plus ou moins 0.02. Donc le chlore n'a aucun effet pour renverser l'effet de la SPD sur les paramètres de fluorescence.

[ SPD ] ( mM )	NaCl ( mM )	$\phi_0$	Fo / Fm
PSII contrôle	-----	0.48	0.52
-----	100	0.44	0.56
3	-----	0.14	0.86
3	100	0.12	0.88
-----	50	0.45	0.55
3	-----	0.15	0.85
3	50	0.15	0.85
-----	10	0.48	0.52
3	-----	0.14	0.86
3	10	0.14	0.86
-----	5	0.46	0.54
3	-----	0.16	0.84
3	5	0.15	0.85
-----	1	0.44	0.55
3	-----	0.16	0.86
3	1	0.16	0.86

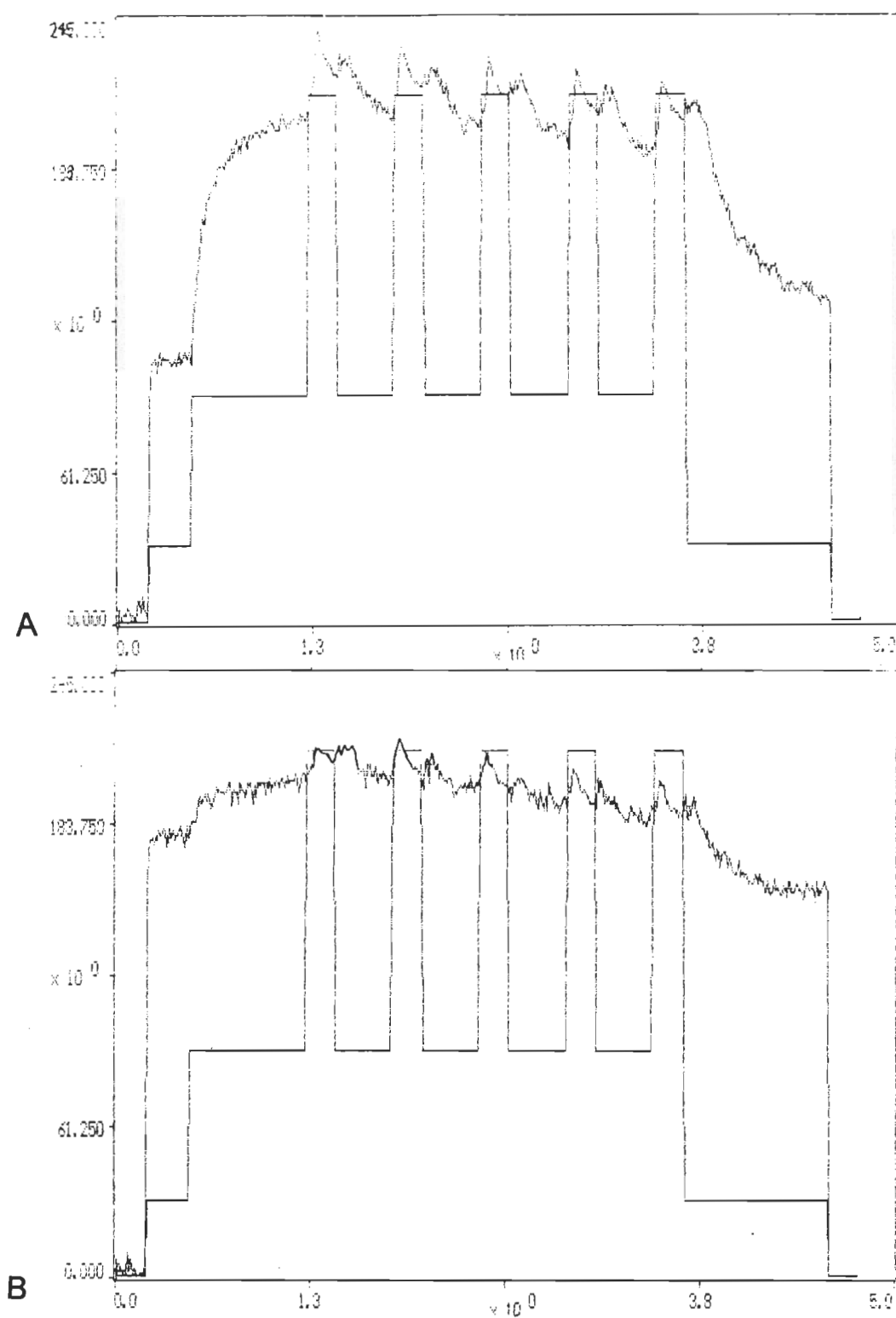
Tableau 9 Effet du chlore sur l'inhibition du PSII traité par la SPD.



### **5.3.3 ETUDE DE LA SPM PAR FLUORESCENCE :**

Un rappel concernant la SPM. La SPM enlève deux protéines extrinsèques (24 et 16 kDa) du PSII et inhibe le dégagement d'O<sub>2</sub>. Donc cet inhibiteur agit au niveau du CDO.

La figure 25, représente le tracé de fluorescence du PSII contrôle (en haut) et le PSII inhibé par 3 mM de SPM (en bas). Sur ce tracé on note que  $F_o$  est augmentée tandis que  $F_{vmax}$  et  $F_m$  sont diminuées sur le tracé du PSII traité avec 3 mM de SPM par rapport au contrôle. Il est à noter que ces deux tracés ont la même échelle de 0 à 245. Sur le tracé du PSII inhibé avec la SPM, la  $F_o$  est augmentée par rapport au contrôle (183 versus 100 pour l'échelle à gauche des tracés). Comme mentionné précédemment, cette augmentation de  $F_o$  implique une altération des complexes collecteurs de lumières. Cette altération des antennes n'est cependant pas visible sur le gel d'électrophorèse de la SPM. Cette diminution de  $F_{vmax}$  peut-être causée par des dommages au niveau du côté donneur d'électrons du PSII. Si le CDO est endommagé l'arrivée des électrons au centre réactionnel est fortement atténué ce qui diminue la réduction de  $Q_A$  (plus de quinone oxydée). En effet l'électrophorèse démontre clairement que le CDO est atteint car il y a perte de deux protéines extrinsèques.



**Figure 25 :** Courbe de fluorescence chlorophyllienne de ( en haut, A) PSII contrôle et ( en bas, B) PSII inhibé par 3 mM de SPM.

Les résultats concernant la variation de  $F_o/F_m$  en fonction des concentrations de SPM, sont présentés sur la figure 26. Si on regarde cette figure,  $F_o/F_m$  du contrôle est de 0.48 tandis que celui du PSII traité avec 3 mM de SPM est égale à 0.84. Ces résultats ont un écart type de plus ou moins 0.02. Ce rapport augmente graduellement puis diminue à partir de 5 mM. Il est à noter que la SPM n'enlève aucune protéine associée aux antennes comparativement à la SPD qui en enlève une. Donc à faible concentrations de SPM il y aurait altération des antennes qui sont possiblement déconnectés des photosystèmes tandis qu'à de grandes concentrations il se pourrait que la SPM provoque l'aggrégation des CCLII ce qui amène un quenching de  $F_o$ <sup>92</sup>.

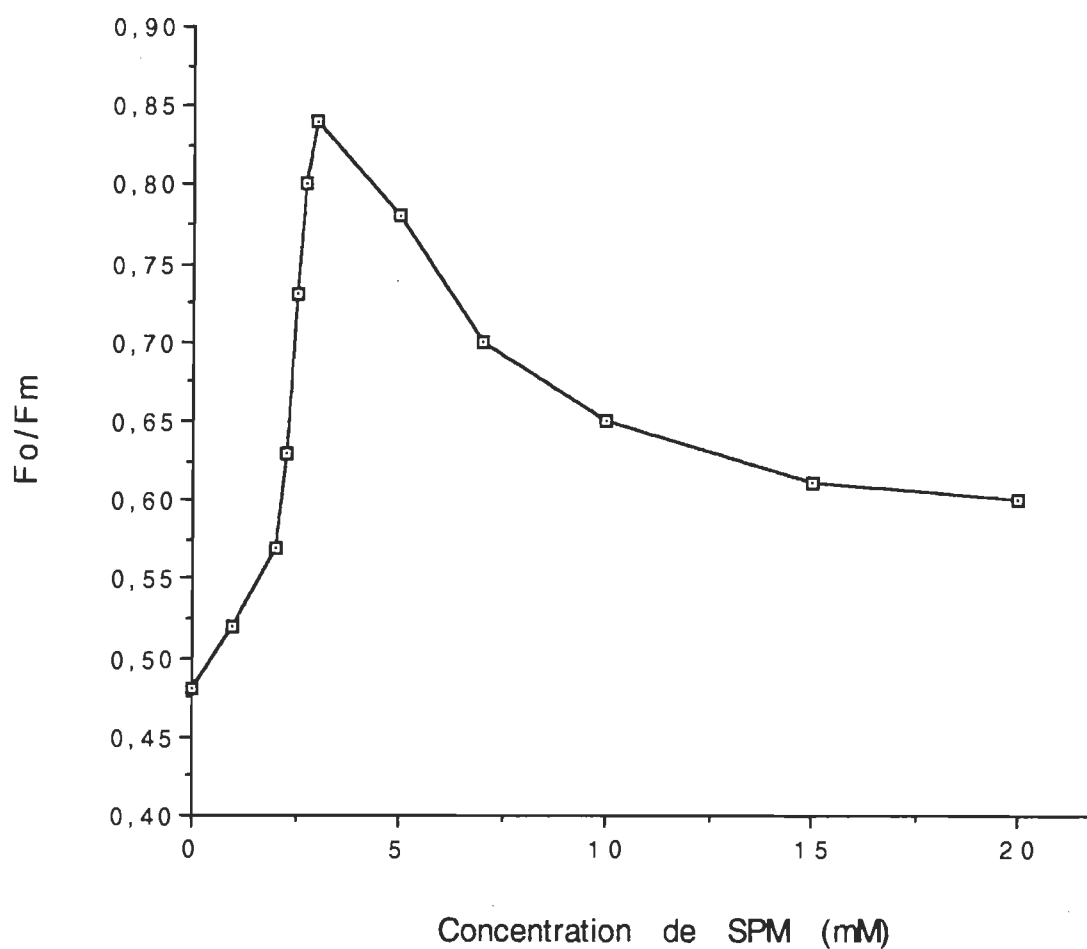


Figure 26 : Graphique de  $F_o/F_m$  en fonction des concentrations de SPM. Le contrôle et le PSII traité avec 3 mM de SPM ont respectivement un  $F_o/F_m$  de 0.48 et 0.84.

La figure 27 met en relation le rendement quantique ( $\phi_0$ ) avec les concentrations de SPM. Dans cette figure le  $\phi_0$  du contrôle est de 0.52 tandis que celui du PSII inhibé par 3 mM de SPM est égale à 0.16. L'écart type est de plus ou moins 0.02. Au début de ce graphique le  $\phi_0$  diminue puis augmente à partir de 3 mM pour terminer avec une valeur de 0.4. Par conséquent cela nous indique que pour le PSII traité avec la SPM le rapport  $F_{vmax} / F_m$  est diminué et donc  $F_{vmax}$  diminue. Cette atténuation de la fluorescence démontre que le côté donneur d'électron est endommagé par le polyamine. La diminution de ce rapport du  $\phi_0$  implique une atteinte à l'état physiologique (CDO endommagé) du PSII par un stress (SPM).

Pour comprendre davantage l'allure des figure 26 et 27 qui représentent les paramètres  $F_o/F_m$  et  $\phi_0$  en fonctions des concentrations de SPM, il faudra faire trois autres graphiques supplémentaires soit  $F_{vmax}$ ,  $F_o$  et  $F_m$  en fonction des concentrations de SPM (figure 28 A et B).

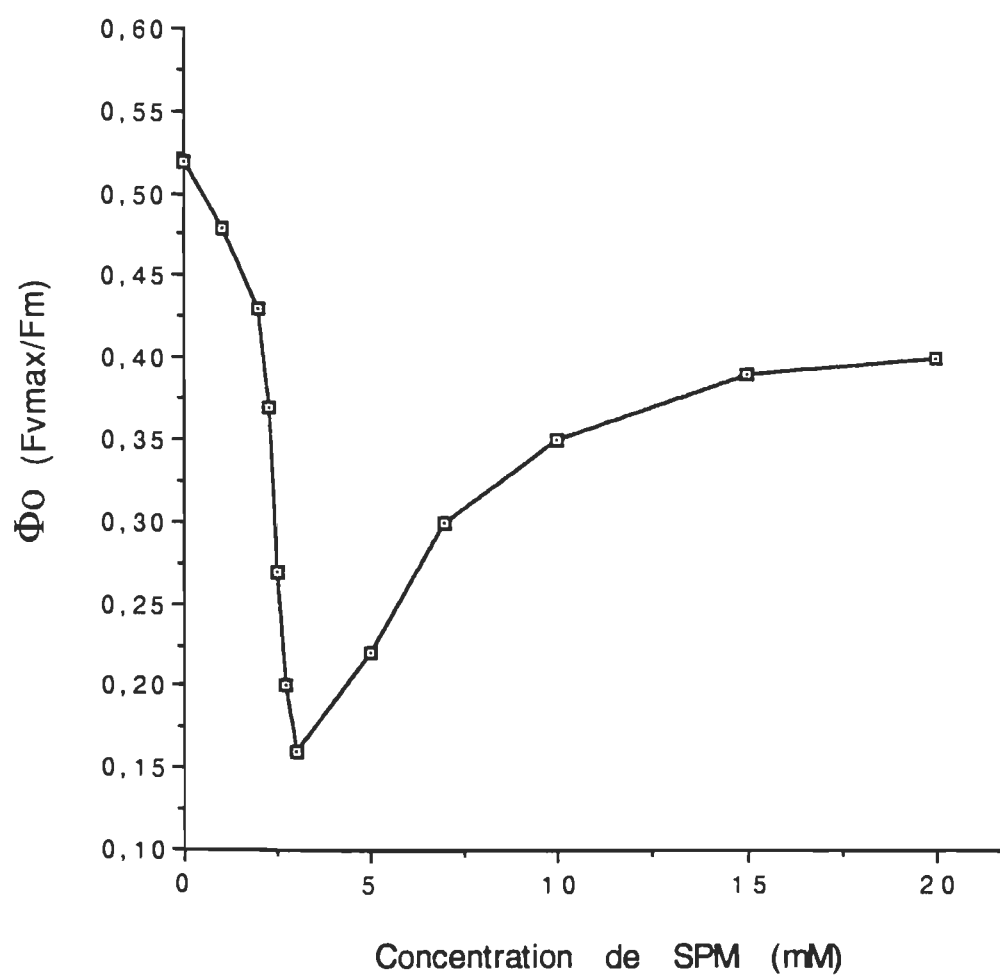


Figure 27 : Graphique du  $\phi_0$  en fonction des concentrations de SPM. Le contrôle et le PSII inhibé par 3 mM de SPM ont un  $\phi_0$  respectifs de 0.52 et 0.16

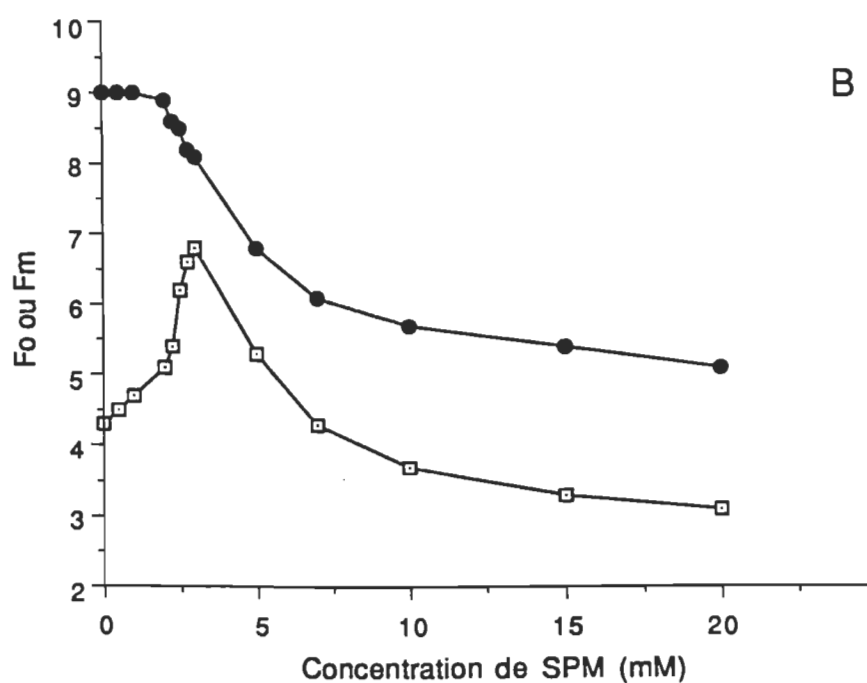
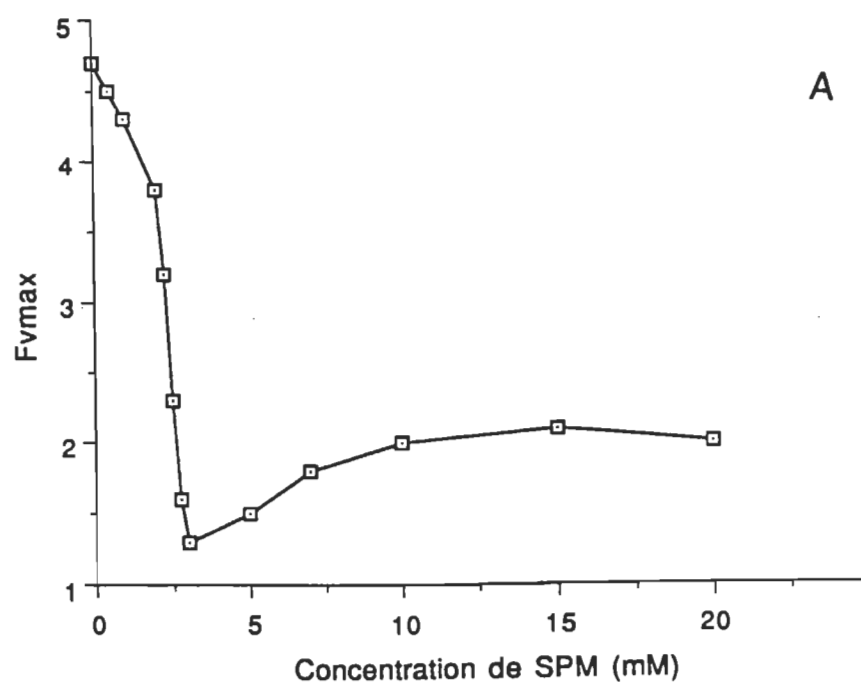


Figure 28: Graphique A:  $F_{vmax}$  en fonction des concentrations de SPM.

Graphique B:  $F_o$  (□) et  $F_m$  (●) en fonction des concentrations de SPM.

En comparant l'allure de la figure 27 ( $\phi_0 = F_{vmax}/F_m$ ) avec la figure 28 A ( $F_{vmax}$ ), on remarque que ces deux graphiques ont globalement la même allure avec des valeurs minimales à 3 mM. La similitude de ces deux graphiques implique que l'allure du graphique obtenu avec  $\phi_0$  dépend de  $F_{vmax}$  qui donne l'allure de ce graphique. Le graphique 28 B démontre que  $F_m$  diminue en fonction de l'augmentation des [SPM] et par conséquent l'allure du graphique 27 est influencé directement par la diminution de  $F_{vmax}$  et de  $F_m$ . Le tracé de  $F_o$  (figure 28 B) augmente jusqu'à 3 mM puis diminue. Une augmentation de  $F_o$  implique l'altération des CCLII tandis qu'à de grandes concentrations (supérieures à 3 mM) il se pourrait que la SPM provoque l'aggrégation des CCLII ce qui amène un quenching de  $F_o$  <sup>92</sup>.

L'allure des graphiques présentée aux figures 26 ( $F_o/F_m$ ) et 28 B ( $F_o$ ) est similaire avec des valeurs maximales à 3 mM. La similitude de ces deux graphiques démontre clairement que l'allure de la figure 26 avec le paramètre  $F_o/F_m$  est directement reliée à la variation de  $F_o$ . La figure 28 B ( $F_m$ ) est similaire (pour des [SPM] supérieures à 3 mM) à l'allure du graphique de  $F_o/F_m$ . Donc  $F_o$  et  $F_m$  influence directement l'allure de  $F_o/F_m$ .



### **5.3.3.1 EFFET DU CALCIUM SUR LE PSII INHIBÉ PAR LA SPM.**

Dans la section 5.1.3, les expériences démontraient qu'au dégagement d'O<sub>2</sub> le calcium pouvait renverser l'inhibition causée par la SPM. En électrophorèse, le Ca<sup>+2</sup> n'avait aucun effet sur l'enlèvement des deux protéines extrinsèques. Donc regardons l'effet de cet ion sur les paramètres suivants :  $\phi_0$  et Fo / Fm. Le sel de calcium employé est le Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

En comparant  $\phi_0$  et Fo / Fm du contrôle (0.52 et 0.48) aux valeurs pour le PSII traité par 100 mM de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.10 et 0.90), une inhibition par le calcium est évidente (tableau 10). À des concentrations inférieures à 3 mM, le calcium n'a plus beaucoup d'effet sur le PSII contrôle. Peu importe la concentration de calcium ajoutée au PSII inhibé par 3 mM de SPM, le résultat est similaire au PSII inhibé sans calcium pour les rapports de Fo / Fm et  $\phi_0$ . Par conséquent, le calcium ne renverse pas l'effet de la SPM sur les paramètres de fluorescence parce que ces paramètres sont influencés par la modification de Fo causée par l'action de la SPM sur l'antenne et non sur le CDO.

[SPM] (mM)	[Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] (mM)	$\phi_0$	Fo / Fm
PSII contrôle	-----	0.52	0.48
-----	100	0.10	0.90
3	-----	0.14	0.86
3	100	0.12	0.88
-----	10	0.43	0.57
3	-----	0.15	0.85
3	10	0.15	0.85
-----	5	0.46	0.54
3	-----	0.16	0.84
3	5	0.15	0.85
-----	3	0.50	0.50
3	-----	0.16	0.84
3	3	0.14	0.86
-----	1	0.50	0.50
3	-----	0.13	0.87
3	1	0.12	0.88

Tableau 10 Effet du calcium sur l'inhibition du PSII par la SPM

### 5.3.4..DISCUSSION

Globalement, les deux polyamines étudiées exercent un effet similaire sur les paramètres de fluorescence. La  $F_o$  augmente tandis que la fluorescence variable diminue. Cette augmentation de  $F_o$  implique une altération des antennes ou du CCLII tandis que la diminution de  $F_{vmax}$  et  $F_m$  représente une atteinte au niveau du côté donneur d'électrons. Le CDO étant altéré, la réduction de  $Q_A$  diminue et la fluorescence émise est diminuée.

Dans le cas de la SPM (voir section 5.3.3) la valeur du PSII traité avec 20 mM de SPM est légèrement inférieure à la valeur de  $\phi_0$  pour le PSII contrôle (0.40 versus 0.52). Les paramètres  $F_o / F_m$  pour la SPM indique qu'à de hautes concentrations de SPM (environ 5 mM) ce polyamine pourrait aggréger les CCLII de part ses quatre charges positives et ainsi quencher  $F_o$  ce qui diminue le rapport  $F_o/F_m$  vers la valeur contrôle<sup>92</sup>. Comment expliquer cette différence entre la SPM et la SPD? Aucun résultat de fluorescence sur la SPM ne permet de faire d'hypothèse. Nos cofacteurs inorganiques, calcium et chlore, n'ont aucun effet pour renverser l'action inhibitrice des polyamines en fluorescence car ces ions n'affectent pas la modification de  $F_o$  par les polyamines. Ces ions affectent le CDO.

#### **5.4 ETUDE DE LA VARIATION DES PROPRIÉTÉS D'ABSORPTION DES PIGMENTS.**

Dans le chapitre de la fluorescence, les résultats démontrent que les deux polyamines étudiées augmentent  $F_o$ . Cette modification de  $F_o$  est causée par l'altération des antennes du PSII. De plus, les expériences d'électrophorèse indiquent que la SPD enlève une protéine liée au système antennaire, le CCLII ou/et la CP29. C'est pour tenter de comprendre ce changement au niveau de l'antenne que des spectres d'absorption dans le domaine du visible ont été effectués.

Ces spectres sont réalisés de la même manière pour la SPM et la SPD. La concentration de Chl utilisée est de 10  $\mu\text{g/ml}$ . Les concentrations de polyamines choisies sont de 0 (contrôle), 0.3 et 1.5 mM. Les spectres ont été mesurés aux longueurs d'ondes comprises entre 350 à 750 nm.

La figure 29 représente le spectre d'une suspension enrichies en pigments photosynthétiques du PSII. Pour plus de clarté, les spectres obtenus en présence des polyamines ont été enlevés car ceux-ci sont similaires au spectre du PSII contrôle. Il y a quatre pics d'absorbance importants. Les

longueur d'onde de ces quatre pics dans l'ordre sont de 438, 471, 656 et 678 nm. Les pics à 438 et 678 nm correspondent à la Chl a tandis que les deux autres pics de 471 et 656 nm représentent la Chl b. Les caroténoïdes absorbent entre 375 et 512 nm<sup>93</sup>.

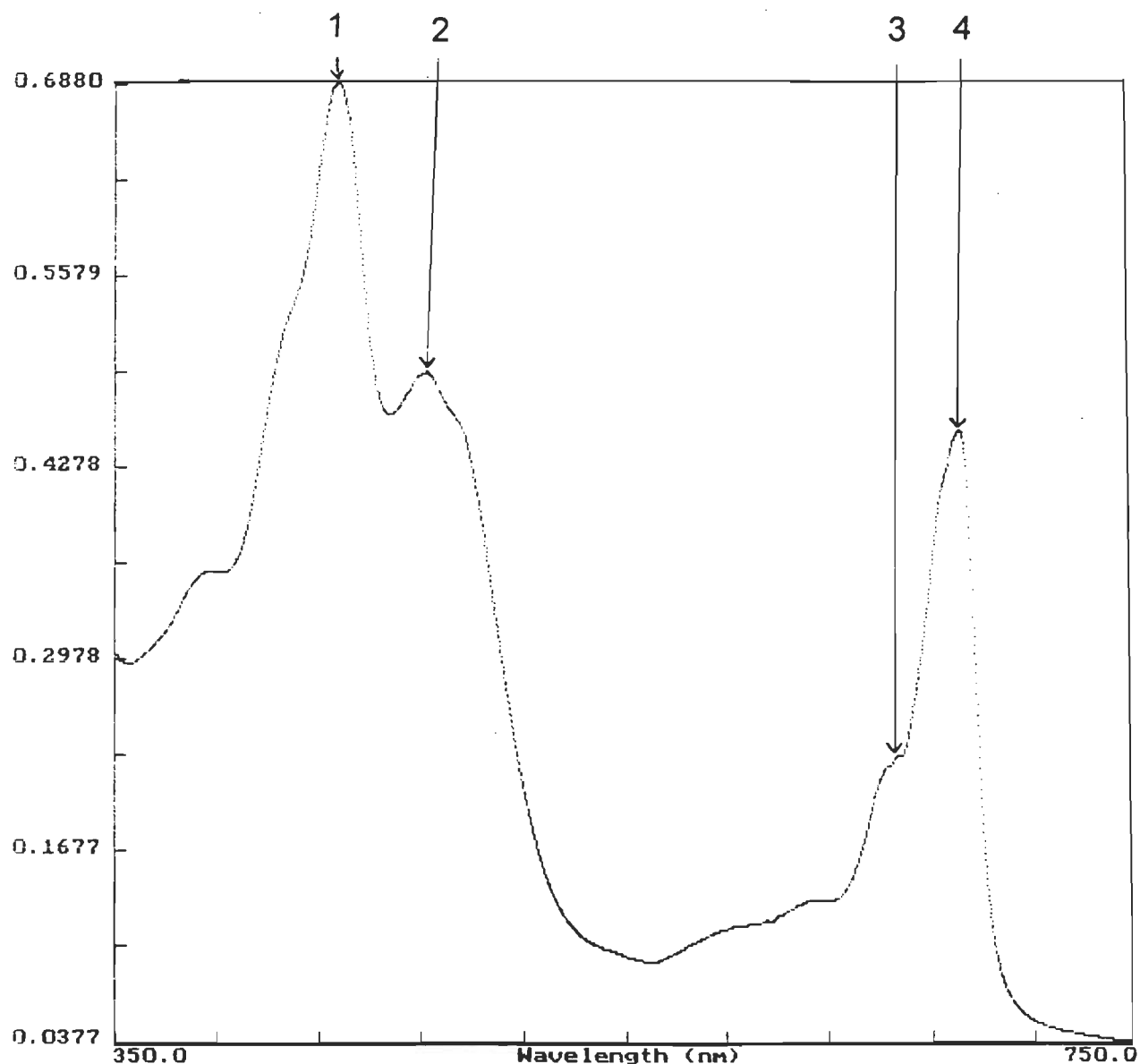


Figure 29 Spectre d'absorbance d'une suspension de membranes enrichies en PSII. Le pic 1 = 438 nm, pic 2 = 471 nm, pic 3 = 656 nm et pic 4 = 678 nm

Pour observer les modifications au niveau des Chl, il fallait faire des rapports d'absorbances entre deux pics. Les deux rapports choisis sont; 438/678 et 471/678. Il est à noter que l'ordinateur indique précisément l'absorbance de chaque pic. Par exemple, (voir figure 29) le pic 1 à 438 nm et le pic 4 à 678 nm ont respectivement des absorbances de 0.6858 et de 0.4503 donc le rapport pour ces deux pics est de  $0.6858/0.4503$  qui est égal à 1.5. Ces rapports sont effectués pour observer les variations d'absorbances entre le contrôle et les échantillons exposés à 0.5 ou 1.5 mM de polyamine.

Le tableau 11 représente ces rapports d'absorbance (438/678 et 471/678) en fonction des concentrations de polyamines. Le rapport 471/678 est identique pour la SPM et la SPD soit 1.09 – 1.08 tandis que le rapport 438/678 diminue en augmentant la concentration de polyamines (1.5 versus 1.4). Pour ce rapport les résultats obtenus sont de 1.5, 1.45 et 1.4 pour le contrôle, 0.3 et 1.5 mM de SPM respectivement ainsi que 1.5, 1.46 et 1.41 pour le contrôle, 0.3 et 1.5 mM de SPD respectivement. Cette diminution du rapport 438/678 correspond à une variation de moins de 7 % seulement et demeure donc peu significative.

[polyamine] (mM)	438 / 678	471 / 678
<b><u>SPERMINE</u></b>		
PSII contrôle	1.5	1.09
0.3	1.45	1.09
1.5	1.4	1.08
<b><u>SPERMIDINE</u></b>		
PSII contrôle	1.5	1.09
0.3	1.46	1.09
1.5	1.41	1.08

Tableau 11 Tableau des rapports d'absorbances des PSII contrôle comparativement aux PSII inhibés

### 5.4.1 DISCUSSION

Les résultats obtenus démontrent que le rapport des absorbances à 438 et 678 nm est diminué de 6.7 % pour nos deux polyamines par rapport au contrôle. L'autre rapport 471 / 678 demeure constant. Cette variation du rapport 438 / 678 peut indiquer une altération du moment dipolaire de la transition d'absorption à 438 nm. Cette baisse d'absorbance demeure cependant peu significative bien qu'il évident que les Chl a contenues dans les antennes sont légèrement atteintes. Les antennes proximales et distales du PSII respectivement CP43, CP47 et CCLII, CP24, CP26, CP29 possèdent tous des Chl a. Donc il est impossible de spécifier laquelle des antennes est atteinte. On sait que la SPD enlève une protéine reliée à l'antenne distale (CP29 ou CCLII) mais est-ce qu'elle modifie aussi d'autres complexes pigments-protéines? La SPM n'enlève aucune protéine de l'antenne. Néanmoins la variation de Fo en présence de SPD ou de SPM indique une modification de l'antenne pigmentaire.



## **6 CONCLUSION FINALE**

Les polyamines sont présentes dans l'appareil photosynthétique à l'état de trace où ils jouent des rôles importants : stabilisation de la membrane, rôle dans la fluidité membranaire, interaction avec des macromolécules biologiques etc... Le but de ma recherche est d'étudier l'effet d'ajout exogène de polyamines sur le PSII. Cette recherche sur l'action des polyamines démontre des résultats inattendus.

### **6.1 ACTION SUR LE CÔTÉ DONNEUR D'ÉLECTRONS**

Le côté donneur d'électrons du PSII ou CDO est constitué des trois protéines extrinsèques de 33, 24 et de 16 kDa et de quatre manganèses responsables des états d'oxydation de H<sub>2</sub>O. Le dégagement d'oxygène du PSII est inhibé par l'ajout exogène des polyamines SPM et SPD. En effet, les électrophorèses confirment l'altération du côté donneur d'électrons par l'enlèvement des trois protéines extrinsèques (33, 24 et 16 kDa ) et d'une protéine antennaire ( CCLII ou/et CP29 ) dans le cas de la SPD. En ce qui concerne la SPM, elle enlève seulement deux protéines extrinsèques (24 et 16 kDa). Donc, les protéines du côté donneur d'électrons sont enlevées par l'action inhibitrice des polyamines. Un autre facteur confirme l'altération du CDO, c'est la diminution de la fluorescence variable (Fvmax et Fm). Ce

résultat démontre que les électrons parviennent plus difficilement au P680 ce qui diminue le taux de réduction de  $Q_A$ .

Ces trois techniques expérimentales confirment hors de tout doute que l'action inhibitrice se déroule au niveau du côté donneur d'électrons. Les électrophorèses illustrent bien le lieu exact d'inhibition des PA sur le CDO car des protéines extrinsèques sont supprimées.

## **6.2 EFFET DU CALCIUM ET DU CHLORE**

Le calcium et le chlore renversent l'inhibition du dégagement d'oxygène par la SPD tandis que seul le  $Ca^{+2}$  renverse l'inhibition causée par la SPM. Je crois que le  $Cl^-$  est dépendant de la protéine extrinsèque de 33 kDa dans le sens où l'action inhibitrice de la SPD qui enlève cette protéine est renversée par le chlore et que l'inhibition du PSII par le mercure enlève aussi cette protéine et elle peut être renversée par le chlore également <sup>62</sup>. L'inhibition de la SPM qui n'enlève pas cette protéine n'est pas renversé par cet ion. Le calcium et/ou le chlore renverse l'inhibition causée par l'enlèvement de la 24 et de la 16 kDa. Il se pourrait que le polypeptide de 33 kDa lié aux protéines intrinsèques (CP47, D1, D2) amène la formation d'un site ou des sites pour le

chlore. L'enlèvement de ce polypeptide pourrait diminuer de beaucoup l'affinité du chlore ou / et modifier le(s) site(s) de liaisons du chlore le rendant ainsi inapte à se fixer sur son site.

### **6.3 EFFET DES POLYAMINES SUR LES ANTENNES ET LA CHL *a***

Dans le gel d'électrophorèse de la SPD à part l'enlèvement des trois protéines extrinsèques, il y a aussi l'enlèvement d'une protéine antennaire d'environ 28 kDa correspondant au CCLII ou / et la CP29. La SPM n'a aucun effet sur les antennes au niveau du gel. Cependant la fluorescence dévoile que la SPD et la SPM modifient partiellement le système antennaire par une augmentation considérable de la  $F_0$  par rapport au contrôle. La fluorescence constante ( $F_0$ ) provient des dé-excitations précédant le transfert des excitons de l'antenne pigmentaire vers le P680 et ne dépend donc pas du processus photochimique (du transport d'électrons). Un changement dans la valeur de  $F_0$  indique une altération, modification d'un ou plusieurs complexes antennaires. La spectroscopie d'absorbance démontre une modification d'environ 6.7% de l'absorbance des Chl *a* possiblement reliée à cet effet.

#### **6.4 MODE D'ACTION DES POLYAMINES (EXOGENES) À TRÈS HAUTE CONCENTRATION.**

La SPM et la SPD sont des polycations qui sont chargés positivement avec respectivement quatre et trois charges positives, et pourront modifier la charge négative à la surface des membranes. Cette perturbation de la charge des PSII amène un changement conformationnel et une réorganisation des complexes protéines-pigments causée par la diminution des forces répulsives entre les constituants membrannaires <sup>94</sup>. Un autre élément à ne pas oublier, c'est le gradient de protons qui est aussi partiellement détruit par le changement de charge, de potentiel de la membrane du PSII inhibé par les polyamines <sup>73</sup>. Je crois que le facteur clé de l'inhibition des polyamines c'est qu'ils sont des polycations altérant la charge globale négative de la surface de la membrane ainsi que le gradient de protons <sup>3, 73, 95</sup>.

L'altération de la charge négative de la surface membranaire pourrait agir au niveau du CDO en détruisant les liens électrostatiques entre les protéines extrinsèques à cause d'interactions entre ces polycations et les protéines. L'antenne du PSII peut être modifiée par la perte du gradient de protons et par une réorganisation des complexes pigments-protéines causée par la diminution des forces répulsives entre les constituants des antennes provoquée par l'ajout exogène de ces polycations.

Bograh, et al. (1997) ont étudié l'action de la SPM et de la SPD sur le PSII par FTIR (spectroscopie infra-rouge avec transformation de Fourier). J'ai coopéré avec M. Bograh dans cette publication en fournissant les données relatives aux dégagement d'O<sub>2</sub> et à l'isolement de membranes enrichies en PSII. Les résultats démontrent clairement qu'à des faibles concentrations de 0.01 et 0.1 mM de SPM et de SPD respectivement, des modifications surviennent dans la structure secondaire des protéines. Les hélices  $\alpha$  diminuent tandis que les feuillets  $\beta$  augmentent par rapport au PSII non traité pour les préparations de PSII inhibé par les polyamines. Ces modifications au niveau des structures secondaires amènent l'inhibition au dégagement d'oxygène de 18 et 6 % à ces concentrations de polyamines respectivement <sup>67</sup>. A des hautes concentrations ces modifications s'intensifient, proportionnellement à l'inhibition au dégagement d'oxygène. A une concentration de polyamines de 20 mM, les structures hélices  $\alpha$  diminuent de 47 % (contrôle) à 37 % ( PSII inhibé) tandis que les structures feuillets  $\beta$  augmentent de 18 % (contrôle) à 29 % (PSII inhibé) <sup>67</sup>. Ces changements dans les structures secondaires peuvent expliquer l'inhibition du dégagement d'oxygène, l'altération des antennes ainsi que les protéines enlevées par ces polycations.

Les polyamines ont plusieurs fonctions importantes chez les végétaux (voir chapitre 3 sur les polyamines). Mais comment concilier les effets positifs

aux concentrations physiologiques de PA avec les résultats obtenues par ma recherche. La SPD et la SPM existent à l'état de traces au niveau du PSII avec 0.38 et 0.17 nmol/mg de Chl<sup>3</sup> respectivement. Lors de mes expériences, les concentrations de Chl utilisées étaient de 10 et 100 µg/ml correspondant à 3.8 et 1.7 pmoles (SPD et SPM) et à 38 et 17 pmoles (SPD et SPM) respectivement. Donc, les concentrations physiologiques des polyamines dans le PSII (de l'ordre des pmoles) sont de beaucoup inférieures aux concentrations prises lors de ma recherche (de l'ordre des mmoles). La très grande différence entre les concentrations de PA ajoutées aux thylacoïdes enrichis en PSII de manières exogènes (mmoles) et les concentrations endogènes de PA (pmoles) expliquent les effets négatifs des PA observés dans ce travail.

Deux métaux lourds et polluants de l'environnement, le Zn<sup>+2</sup> et le Pb<sup>+2</sup> provoquent l'enlèvement partiel de la 33 et l'enlèvement significatif de la 24 et de la 16 kDa. Ces métaux ont, comme la spermidine, la propriété d'enlever deux protéines de manière significative. Le calcium peut renverser l'effet du Pb<sup>+2</sup> mais, pas celui du Zn<sup>+2</sup>.<sup>95, 96</sup> Le rouge de ruthénium, un polycation, enlève les protéines extrinsèques de 16 kDa (totalement) et 24 kDa (partiellement) et l'inhibition peut-être renversée par le calcium et le chlore<sup>78, 79</sup>.<sup>80</sup> Cet inhibiteur agit similairement à la SPM pour l'enlèvement de deux protéines extrinsèques de 16 et 24 kDa sauf que l'inhibition est renversée

seulement par le calcium et non par le chlore. Le tétranitrométhane (TNM) agit en enlevant les trois protéines extrinsèques du PSII <sup>77</sup>. Il a la même action que la spermidine sur l'enlèvement des protéines bien que l'effet inhibiteur du TNM n'est pas renversé par l'ajout de chlore ou de calcium comparativement à la SPD. Le mercure enlève la protéine de 33 kDa et son action sur le PSII peut être renversé par le chlore <sup>76, 62</sup>. Les polyamines se comportent de façon similaire aux métaux lourds qui sont des cations divalents en enlevant des protéines extrinsèques du PSII.

## **6.5 PERSPECTIVES FUTURES**

Il serait intéressant d'étudier l'autre polyamine rencontrée chez les plantes, la putrescine. Afin d'établir une relation entre le nombre de charges positives (2+) et le pouvoir inhibiteur de ce PA. Étant donné que la SPD enlève les trois protéines extrinsèques, il serait justifié de regarder si un ou des Mn s'enlèvent par l'extraction de la protéine stabilisatrice des Mn, la 33 kDa. Pour les deux PA étudiées, il serait fort utile de faire des gels verts qui sont des gels spéciaux pour les complexes protéines-pigments afin de mieux visualiser et comprendre l'effet des PA sur ces complexes car le paramètre  $F_0$  est augmenté en fluorescence pour les deux PA indiquant une altération de ces complexes.

## 7-RÉFÉRENCES

- 1 Heller, R., Esnault, R., Lance, C. (1985) Physiologie végétale, édition Masson, 5<sup>e</sup> édition.
- 2 Yamamoto, Y. (1989) Molecular organization of oxygen evolution system in chloroplast, Bot. Mag. Tokyo 102, 565-582.
- 3 Kotzabasis, K., Fotinou, C., Roubelakis-Angelakis, K.A. and Ghanotakis, D. (1993) Polyamines in the photosynthetic apparatus, Photosynth. Res., 38, 83-88
- 4 Mazliak, P., Laval-Martin, D. (1990) Travaux pratiques et travaux dirigés de physiologie végétale, Paris, collection méthodes.
- 5 Sarry, J-E., Montillet, J-L., Sauvaire, Y. and Havaux, M. (1994) The protective function of the xanthophyll cycle in photosynthesis, FEBS Lett. 353, 147-150.
- 6 Morrissey, P.J., Glick, R.E. and Melis, A. (1989) Supramolecular assembly and function of subunits associated with the chlorophyll a-b light-harvesting complex II (LHCII) in soybean chloroplasts, Plant Cell. Phys. 30, 335-344.
- 7 Kühlbrandt, W., Wang, D.N. and Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography, Nature 367, 614-621.
- 8 Spangfort, M., Larsson, U.K., Anderson, J.M. and Andersson, B. (1987) Isolation of two different subpopulations of the light harvesting chlorophyll a/b complex of photosystem II, FEBS Lett. 224, 343-347.
- 9 Camefort, H., (1972) Morphologie des végétaux vasculaires, Paris, Dorin éditeur.



- 1 0 Svensson, P., Andreasson, E. and Albertsson, P-A. (1991) Heterogeneity among photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* 1060, 45-50.
- 1 1 Andreasson, E. and Albertsson, P-A. (1993) Heterogeneity in photosystem I - the larger antenna of photosystem I a is due to functional connection to a special pool of LHCII, *Biochim. Biophys. Acta* 1141, 175-182.
- 1 2 Albertsson, P-A., Shi-Gui, Y. (1990) Heterogeneity in photosystem IIa : evidence from fluorescence and gel electrophoresis experiments, *Biochim. Biophys. Acta* 1016, 137-140
- 1 3 Albertsson, P-A., Andreasson, E. and Svensson, P. (1990) The domain organization of the plant thylakoid membrane, *FEBS Lett.* 273, 36-40.
- 1 4 Leong, T-Y. and Anderson, J.M. (1983) Changes in composition and function of thylakoid membranes as a result of photosynthetic adaptation of chloroplasts from pea plants grown under different light conditions, *Biochim. Biophys. Acta* 723, 391-399.
- 1 5 Albertsson, P-A. and Yu, S.G. (1988) Heterogeneity among photosystem IIa. Isolation of thylakoid membrane vesicles with different functional antenna size of photosystem IIa, *Biochim. Biophys. Acta* 936, 215-221.
- 1 6 Lavergne, J. (1982) Two types of primary acceptors in chloroplasts photosystem II, *Photobiochem. Photobiophys.* 3, 257-285.
- 1 7 Simpson, D.J. and Von Wettstein, D. (1989) The structure and function of the thylakoid membrane, *Carlsberg Res. Comm.* 54, 55-65.

- 1 8 Andersson and Stryring, Curr. Top. Bioenerg. (1991) Photosystem II: molecular organisation, function and acclimation, 16, Academic press publishing, San Diego.
- 1 9 Staehelin, L.A., Arntzen, C. J. (1983) Regulation of chloroplast membrane function : protein phosphorylation changes the spatial organization of membrane components, J. Cell Biol. 97, 1327-1337.
- 2 0 Allen, J.P., Fehr, G., Yeates, T.O., Komiya, H. and Rees, D.C. (1987) Structure of the reaction center from Rhodobacter sphaeroides R-26: the cofactors, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 5730-5734.
- 2 1 Schatz, G.H., Brock, H., and Holzwarth, A.R. (1987) Kinetic and energetic model for the primary process in PSII, Biophys. Jour. 54, 397-406
- 2 2 Eaton-Rye, J.J. and Govindjee (1988) Electron transfer through the quinone acceptor complex of photosystem II after one or two actinic flashes in bicarbonate-depleted spinach thylakoid membranes, Biochim. Biophys. Acta 935, 248-257.
- 2 3 Hauska, G. and Hurt, E.C. (1982) Function of quinones in energy conserving systems, Academic press, 87-110.
- 2 4 Hauska, G., Hurt, E.C., Gabellini, N. and Lockau, W. (1983) Comparative aspects of quinol-cytochrome C / plastocyanin oxidoreductases, Biochim. Biophys. Acta 726, 97-133.
- 2 5 Haehnel, W. (1980) Evidence for complexed plastocyanin as the immediate electron donor of P700, Biochim. Biophys. Acta 593, 384-399.

- 2 6 Haehnel, W., Ratajczak, R. and Robenek, H. (1989) Lateral distribution and diffusion of plastocyanin in chloroplast thylakoids, *J. Cell Biol.* 108, 1397-1405.
- 2 7 Morand, L., Frame, M.K., Colvert, K.K., Johnson, D.A., Krogmann, D.W. and Davis, D.J. (1989) Plastocyanin cytochrome *f* interaction, *Biochemistry* 28, 8039-8047.
- 2 8 Bhagwat, A.S., Blokesch, A., Irrgang, K.D., Salnikow, J., Vater, J. (1993) Crosslinking of components of the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex from spinach thylakoids by o-phthalaldehyde, *Arch. Biochem. Biophys.* 304, 38-44.
- 2 9 Yu, S.G., Romanowska, E., Xue, Z., Albertsson, P-A. (1994) Evidence for two different Rieske iron-sulfur proteins in the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex of spinach chloroplast, *Biochim. Biophys. Acta* 1185, 239-242.
- 3 0 Allred, D.R., Staehelin, L.A. (1986) Spatial organization of the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex within chloroplast thylakoid membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 849, 94-103.
- 3 1 Albertsson, P-A., Andreasson, E., Svensson, P. and Yu, S-G. (1991) Localization of cytochrome *f* in the thylakoid membrane: evidence for multiple domains, *Biochim. Biophys. Acta* 1098, 90-94.
- 3 2 Hippler, M., Ratajczak, R. and Haehnel, W. (1989) Identification of the plastocyanin binding subunit of photosystem I, *FEBS Lett.* 250, 280-284.
- 3 3 Bottin, H. and Mathis, P. (1987) Turn-over of electron donors in PSI: double flash experiments with pea chloroplasts and PSI particles, *Biochim. Biophys. Acta* 892, 91-98.

- 3 4 Wasielewski, M.R., Fanton, J.M. and Govindjee (1987) The rate of formation of  $P700^+ - A_0^-$  in photosystem I particles from spinach as measured by picosecond transient absorption spectroscopy, *Photosynth. res.* 12, 181-190.
- 3 5 Shuvalov, V.A., Nuijs, A.M., Van Gorkom, H.J., Smit, H.W.J. and Duysens, L.N.M. (1986) Picosecond absorbance changes upon selective excitation of the primary electron donor P-700 in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* 850, 319-323
- 3 6 Brettel, K. (1988) Electron transfer from A<sub>0</sub> to an iron-sulfur center with  $t_{1/2} = 200$  ns at room temperature in photosystem I, *FEBS Lett.* 239,93-98.
- 3 7 Lagoutte, B. and Mathis, P. (1989) The photosystem I reaction center: structure and photochemistry, *Photochem. Photobiol.* 49, 833-844.
- 3 8 Wynn, R.M., Malkin, R. (1988) Characterization of an isolated chloroplast membrane Fe-S protein and its identification as the photosystem I Fe-SA/Fe-SB binding, *FEBS Lett.* 229, 293-297.
- 3 9 Golbeck, J.H. (1987) Structure, function and organization of the photosystem I reaction center complex, *Biochim. Biophys. Acta* 895, 167-204.
- 4 0 De Pascalis, A.R., Schürmann, P., Bosshard, H.R. (1994) Comparison of the binding sites of plant ferredoxin for two ferredoxin dependent enzymes, *FEBS Lett.* 337, 217-220.
- 4 1 Hirasawa, M., Boyer, J.M., Gray, K.A., Davis, D.J. and Knaff, D.B. (1986) The interaction of ferredoxin with chloroplast ferredoxin linked enzymes, *Biochim. Biophys. Acta* 851, 23-28.

- 4 2 Anderson, J.M. and Andersson, B. (1988) The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion, *Trends in Biochem. Sci.* 13, 351-355.
- 4 3 Dilley, R. (1991) Energy coupling in chloroplasts: a calcium gated switch control proton fluxes between localized and delocalized proton gradients, *Curr. Top. Bioenerg.*, 16, 265-318
- 4 4 Alt, J., Morris, J., Westhoff, P, Herrmann, R.G. (1984) Nucleotide sequence of the clustered genes for the 44 kilodalton chlorophyll a apoprotein and the "32 kilodalton" like protein of the photosystem II reaction center in the spinach plastid chromosome, *Curr. Genet.* 8, 597-606.
- 4 5 Deisenhofer, J. and Michel, H. (1989) In "Les prix nobel 1988", Almquistoch Wiksell International, Stockholm, 142-181.
- 4 6 Tang, X.S., Diner, B.A., Larsen, B.S., Gilchrist, M.L., Lorigan, G.A., Britt, R.D. (1994) Identification of histidine at the catalytic site of the photosynthetic oxygen evolving complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 704-708.
- 4 7 Metz, J.G., Nixon, P.J., Rogner, M., Brudvig, G.W. and Diner, B.A. (1989) Directed alteration of the D1 polypeptide of photosystem II: evidence that tyrosine 161 is the redox component connecting the oxygen evolving complex to the primary electron donor, P680, *Biochemistry* 28, 6960-6969.
- 4 8 Allakhverdiev, S.I., Ahmed, A., Tajmir-Riahi, H.-A., Klimov, V.V. and Carpentier, R. (1994) Light-induced Fourier transform infrared spectrum of the cation radical P680<sup>+</sup>, *FEBS Lett.* 339, 151-154

- 4 9 Barber, J. and De Las Rivas, J. (1993) A functional model for the role of cytochrome b<sub>559</sub> in protection against donor and acceptor side photoinhibition, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10942-10946.
- 5 0 Thompson, L.K. and Brudvig, G.W. (1988) Cytochrome b<sub>559</sub> may function to protect photosystem II from inhibition, *Biochemistry* 27, 6653-6658.
- 5 1 Allakhverdiev, S.I., Klimov, V.V. and Carpentier, R. (1997) Evidence for the involvement of cyclic electron transport in the protection of photosystem II against photoinhibition: influence of a new phenolic compound, *Biochemistry* 36, 4149-4154
- 5 2 Vass, I. and Styring, S. (1992) Spectroscopic characterization of triplet forming states in photosystem II, *Biochemistry* 31, 5957-5963.
- 5 3 Carpentier, R. (1997) Handbook of photosynthesis, Influence of high light intensity on photosynthesis: photoinhibition and energy dissipation, ed. Mohammad Pessarakli, Marcel Dekker, inc., New-York, 443-450
- 5 4 Ghanotakis, D.F. and Yocum, C.F. (1990) Photosystem II and the oxygen evolving complex, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 255-276.
- 5 5 Miyao, M. and Murata, N. (1989) The mode of binding of three extrinsic proteins of 33 kDa, 23 kDa and 18 kDa in the photosystem II complex of spinach, *Biochim. Biophys. Acta* 977, 315-321.

- 5 6 Odom, W.R. and Bricker, T.M. (1992) Interaction of CPa-1 with the manganese stabilizing protein of photosystem II: identification of domains cross-linked by 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino) propyl] carbodiimide, *Biochemistry* 31, 5616-5620.
- 5 7 Ono, T. and Inoue, Y. (1984) Reconstitution of photosynthetic oxygen evolving activity by rebinding of 33 kDa protein to  $\text{CaCl}_2$  extracted PSII particles, *FEBS Lett.* 166, 381-384
- 5 8 Ono, T. and Inoue, Y. (1985) S-state turnover in the  $\text{O}_2$  evolving system of  $\text{CaCl}_2$  washed photosystem II particles depleted of three peripheral proteins by thermoluminescence. Removal of 33 kDa protein inhibits  $\text{S}_3$  to  $\text{S}_4$  transition, *Biochim. Biophys. Acta* 806, 331-340.
- 5 9 Murata, N. and Miyao, M. (1989) Photosystem II and oxygen evolution, *Photosynthesis*, 59-70.
- 6 0 Ghanotakis, D.F., Babcock, G.T., Yocum, C.F. (1984) Calcium reconstitutes high levels of oxygen evolution in polypeptide depleted photosystem II preparation, *FEBS Lett.* 167, 127-130.
- 6 1 Andersson, B., Critchley, C. and Ryrle, I. (1984) Modification of the chloride requirement for photosynthetic  $\text{O}_2$  evolution. The role of the 23 kDa polypeptide, *FEBS Lett.* 168, 113-117.
- 6 2 Bernier, M., Carpentier, R. (1995) The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidizing complex of photosystem II, *FEBS Lett.* 360, 251-254
- 6 3 Wiegardt, K. (1994) A structural model for the water oxidizing manganese cluster in photosystem II, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 725-727.

- 6 4 Ono, T., Noguchi, T., Inoue, Y., Kusunoki, M., Yamaguchi, H. and Oyanagi, H. (1994) Study of the intermediate S-states for water oxidation in the normal and Ca-depleted photosynthetic oxygen evolving enzyme by means of flash induced X-ray absorption near edge structure spectroscopy, *Biochem. Soc. Trans.* 22, 331-336.
- 6 5 Brudvig, G.W. and Crabtree, R.H. (1986) Mechanism for photosynthetic O<sub>2</sub> evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4586-4589.
- 6 6 Brudvig, G.W., Beck, W.F. De Paula, J.C. (1989) Mechanism of photosynthetic water oxydation, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 18, 25-46.
- 6 7 Bograh, A., Gingras, Y., Tajmir-Riahi, H.A, Carpentier, R. The effects of spermine and spermidine on the structure of photosystem II proteins in relation to inhibition of electron transport, (1997) *FEBS Lett.* 402, 41-44
- 6 8 Evans, P.T. and Malmberg R.L. (1989) Do polyamines have roles in plant development?, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 235-269
- 6 9 Tabor, C.W. and Tabor H. (1984) Polyamines, *Ann. Rev. Biochem.* 53, 749-790
- 7 0 Cohen, A.S., Popovic, R.B., and Zalik, S, (1979) Effects of polyamines on chlorophyll and protein content, photochemical activity, and chloroplast ultrastructure of barley leaf discs during senescence, *Plant Physiol.* 64, 717-720
- 7 1 Srivastava, SK and Smith TA (1983) The effect of some oligoamines and guanidines on membrane permeability in higher plants, *Phytochemistry* 21, 997-1008



- 7 2 Besford , R.T., Richerson, C.M., Campos, J.L. and Tiburicio, A.F. (1993) Effect of polyamines on stabilisation complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves, *Planta* 189, 201-206
- 7 3 Iordanov, I.T., Goltsev, V., Doltchinkova, V. and Kruleva, L. (1989) Effect of some polyamines on the functional activity of thylakoid membranes, *Photosynthetica* 23, 14-323
- 7 4 Berthold, D.A., Babcock, G.T., Yocum, C.A., (1981) A highly resolved, oxygen evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes, *FEBS Lett.* 134, 231-234
- 7 5 Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685
- 7 6 Bernier, M., Popovic, R. and Carpentier, R. (1993) Mercury inhibition at the donor side of photosystem II is reversed by chloride, *FEBS Lett.* 321, 19-23
- 7 7 Gingras, Y., Harnois, J., Ross, G. and Carpentier, R. Inhibition of oxygen evolution in chloroplast photosystem II by the protein modifying agent tetranitromethane, (1995) *Photochem. Photobiol.* 61, 183-189
- 7 8 Miller, N., Lemieux, S. and Carpentier, R. (1987) Ruthenium red as inhibitor of the oxygen evolving complex of photosystem 2, *Photosynthetica* 21, 509-514
- 7 9 Harnois, J., Carpentier, R. (1991) Relationship between the release of polypeptides and inhibition of photosystem II electron transport by ruthenium red, *Biol. Membr.* 8, 1047-1052

- 8 0 Jursinic, P., Miller, N. and Carpentier, R. (1990) Ruthenium red inhibition of oxygen evolution and specific release of the extrinsic 16 kDa polypeptide in photosystem II preparation, *Photochem. Photobiol.* 51, 705-712
- 8 1 Noguchi, T., Ono, T., Inoue, Y. (1995) A carboxylate ligand interacting with water in the oxygen evolving center of photosystem II as revealed by Fourier transform infrared spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1232, 59-66
- 8 2 Han, K.C., Katoh, S. (1995) Different binding affinity sites of  $\text{Ca}^{+2}$  for reactivation of oxygen evolution in NaCl washed photosystem II membranes represent differently modified states of a single binding site, *Biochim. Biophys. Acta* 1232 230-236
- 8 3 Miyao, M., Murata, N. (1984) Calcium ions can be substituted for the 24 kDa polypeptide in photosynthetic oxygen evolution, *FEBS Lett.* 168, 118-120
- 8 4 Nakatani, H.Y., (1984) Photosynthetic oxygen evolution does not require the participation of polypeptides of 16 and 24 kilodaltons, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 299-304
- 8 5 Carpentier, R. and Nakatani, H.Y. (1985) Inhibitors affecting the oxidizing side of photosystem II at the  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cl}^-$  sensitive sites, *Biochim. Biophys. Acta* 808 288-292
- 8 6 Hoganson, C. W., Babcock, G.T. (1994) Metal ions in biological systems, Photosystem II, H. Sigel and A. Sigel, eds., Dekker, New-York, 77-107
- 8 7 Rashid, A. and Carpentier, R., (1989)  $\text{CaCl}_2$  inhibition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  electron donation to photosystem II in submembrane preparations depleted in extrinsic polypeptides, *FEBS Lett.* 258 331-334

- 8 8 Seidler, A. (1996) The extrinsic polypeptides of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta* 1277, 35-60
- 8 9 Enami, I., Inoue, Y. (1997) Identification of domains on the extrinsic 33 kDa protein possibly involved in electrostatic interaction with photosystem II complex by means of chemical modification, *Jour. Biol. Chem.* 272, 3788-3798
- 9 0 Karukstis, K.K. (1991) Chlorophyll fluorescence as a physiological probe of the photosynthetic apparatus, H. Scheer ed., CRC Press, Boca Raton, 769-795
- 9 1 Allakhverdiev, S.I., Klimov, V.V. and Carpentier, R. (1994) Variable thermal emission and chlorophyll fluorescence in photosystem II particles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 281-285
- 9 2 Ruban, A. V., Horton, P. (1992) Mechanism of pH dependent dissipation of absorbed excitation energy by photosynthetic membranes. 1. Spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complexes, *Biochim. Biophys. Acta* 1102, 30-38
- 9 3 Hader, D.P., Tevini, M. (1987) General photobiology, Pergamon Press, 121-128
- 9 4 Rubin, B.T., Barber, J. (1980) The role of membrane surface charge in the control of photosynthetic process and the involvement of electrostatic screening, *Biochim. Biophys. Acta* 592, 87-102
- 9 5 Miller, M. (1985) The release of polypeptides and manganese from oxygen evolving photosystem II preparations following zinc treatment, *FEBS Lett.* 189 355-360
- 9 6 Rashid, A., Camm, E.L., Ekramoddoullah, A.K.L. (1994) Molecular mechanism of action of  $Pb^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  on water oxidizing complex of photosystem II, *FEBS Lett.* 350, 296-298